

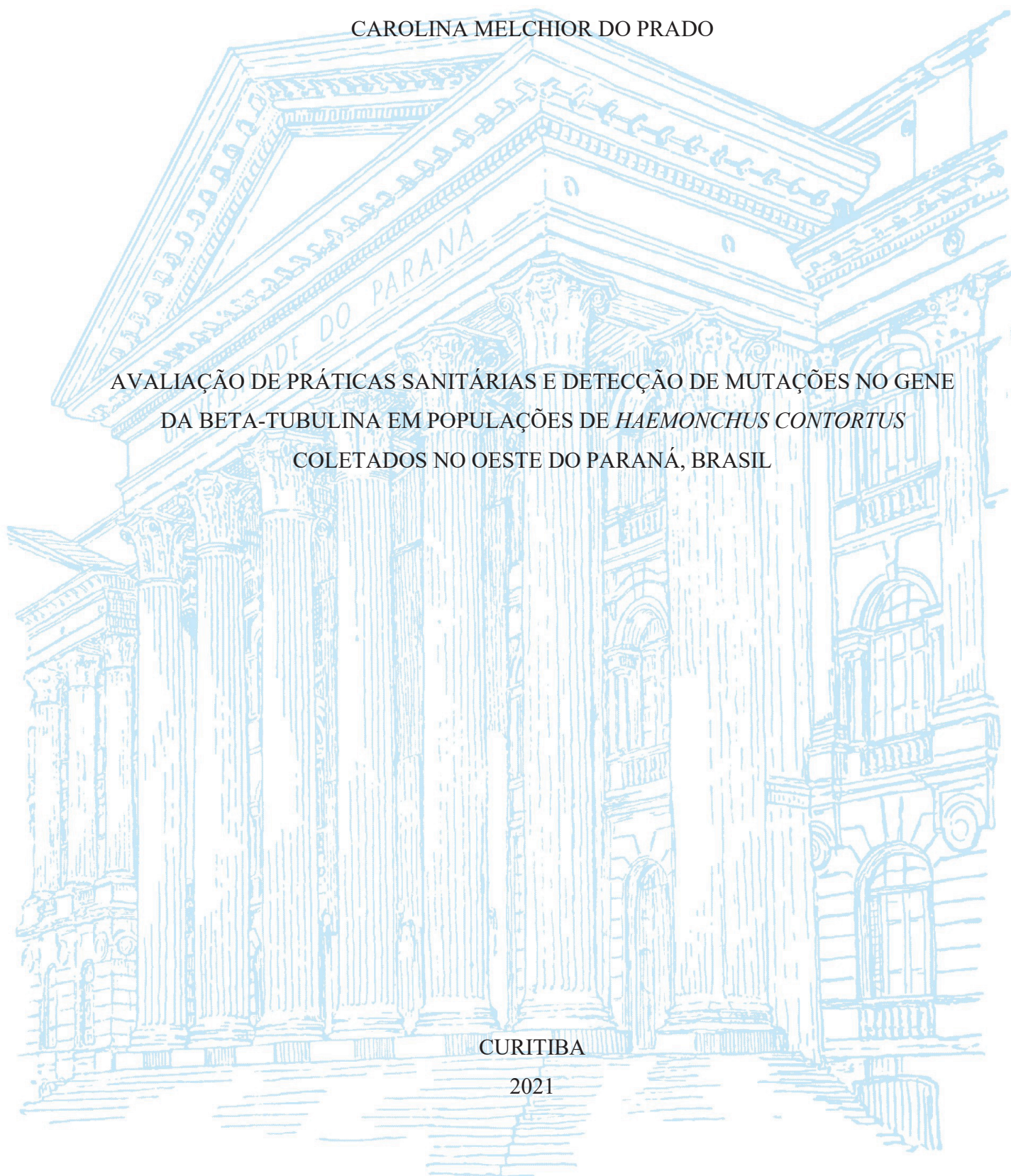
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA MELCHIOR DO PRADO

AVALIAÇÃO DE PRÁTICAS SANITÁRIAS E DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE
DA BETA-TUBULINA EM POPULAÇÕES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*
COLETADOS NO OESTE DO PARANÁ, BRASIL

CURITIBA

2021



CAROLINA MELCHIOR DO PRADO

AVALIAÇÃO DE PRÁTICAS SANITÁRIAS E DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE
DA BETA-TUBULINA EM POPULAÇÕES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*
COLETADOS NO OESTE DO PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

Coorientador: Prof. Dr. Jomar Patrício Monteiro

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Prado, Carolina Melchior do

Avaliação de práticas sanitárias e detecção de mutações no gene da beta-tubulina em populações de *Haemonchus contortus* coletados no oeste do Paraná, Brasil. / Carolina Melchior do Prado. – Curitiba, 2021.
113 p.: il.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento.

Coorientador: Jomar Patrício Monteiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Helminto. 2. Ovinos. 3. Caprinos. 4. Polimorfismo (Genética). I. Título. II. Molento, Marcelo Beltrão, 1964-. III. Monteiro, Jomar Patrício. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 592.57

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA MELCHIOR DO PRADO** intitulada: **Avaliação de práticas sanitárias e detecção de mutações no gene da beta-tubulina em populações de *Haemonchus contortus* coletados no Oeste do Paraná, Brasil**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO BELTRÃO MOLENTO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

31/03/2021 10:12:45.0

MARCELO BELTRÃO MOLENTO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/03/2021 11:25:38.0

CRISTINA SANTOS SOTOMAIOR

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/04/2021 13:39:20.0

ALESSANDRO PELEGRINE MINHO

Avaliador Externo (EMBRAPA)

Aos meus pais Solange e Geraldo;
Ao meu companheiro Marcos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente as três pessoas mais importantes da minha vida e que me ajudaram tremendamente na conclusão desse projeto. Aos meus pais, Solange e Geraldo, por toda a educação e orientação que me deram, pelo constante incentivo ao estudo. Por todos os seus sacrifícios feitos e que me permitiram estar aqui hoje. Ao meu amado companheiro Marcos, por ter sempre acreditado nos meus sonhos mesmo quando eu mesma não acreditava. Por ter me apoiado em todas as minhas decisões, mesmo aquelas que me fizeram estar longe. Por seu meu melhor amigo, me oferecendo toda paciência e calma nos momentos mais difíceis. Agradeço aos três por todo o amor incondicional e por terem lutado junto comigo para que esse projeto desse certo. Por terem estado ao meu lado em vários perrengues, terem levado cabeçadas e pisadas de ovelhas e colocado a mão na massa no desafio de coletar os mais de 600 animais desse projeto. Vocês são o meu porto-seguro. Agradeço também aos meus irmãos Éverton, Giancarlo e Isabella por todo o apoio.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Beltrão Molento, por ter me aceitado e recebido de braços abertos no LPCV. Por toda a sua atenção, dedicação e consideração mesmo nos momentos mais difíceis durante esses dois anos. Pelo constante incentivo que foi essencial na realização desse projeto. Por todas as correções, aulas, debates e desafios que com certeza me tornaram uma pesquisadora muito melhor.

Ao meu coorientador, professor Dr. Jomar Patrício Monteiro da Embrapa Caprinos e Ovinos. Por todo o seu apoio no período de permanência em Sobral. Por sua paciência e dedicação ao me ensinar sobre Biologia Molecular. Por todos os conselhos e ensinamentos que foram fundamentais na minha formação como pesquisadora.

A todos os meus colegas pesquisadores do LPCV e da Embrapa Caprinos e Ovinos, em especial a Úrsula, Yara, Gracielle e Janaélia por toda a ajuda durante a realização dos experimentos desse projeto.

Aos 18 produtores que abriram as portas de suas criações para a realização dos experimentos de campo.

Aos meus amigos da pós-graduação: Douglas, Izadora, Fernanda, Marlon, Alisson e Guilherme, meus queridos companheiros dos rolês mais variados e que me permitiram uma vida feliz em Curitiba.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia por terem expandido meus horizontes intelectuais e contribuído significativamente para a minha formação.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

Marie Curie

RESUMO

A criação de pequenos ruminantes, possui grande importância econômica e social no mundo todo. Dentre os fatores que mais geram impactos negativos na saúde e no bem-estar desses animais, as infecções por helmintos gastrintestinais são uma das mais importantes e o agente *Haemonchus contortus* é o nematoda mais patogênico. *H. contortus* é um parasito hematófago capaz de provocar, em casos severos, a morte do hospedeiro. Em consequência disto, o controle desse helminto é baseado em anos de uso indiscriminado de anti-helmínticos, o que promoveu a seleção de parasitos resistentes. Por serem os mais antigos e mais amplamente utilizados, os benzimidazóis (BZ) são a classe de anti-helmínticos mais associada com a resistência e a mais profundamente estudada. A resistência aos BZ está associada a três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*): F200Y, F167Y e E198A, no isotipo 1 do gene da beta-tubulina. Métodos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) permitem detectar com alta sensibilidade esses SNPs. O objetivo desse estudo foi determinar a frequência de SNPs associados aos BZ em *H. contortus* isolados de 545 ovinos e 124 caprinos de 18 propriedades na região Oeste do Paraná. Foram identificadas práticas de manejo, que podem ser fatores de risco para o desenvolvimento da resistência nessa região. Amostras de fezes foram coletadas de animais em oito municípios: Foz do Iguaçu; Matelândia; Medianeira; Ramilândia; Santa Terezinha de Itaipu; São Miguel do Iguaçu; Serranópolis do Iguaçu e Vera Cruz do Oeste. As propriedades foram georreferenciadas e os criadores responderam a um questionário sanitário. Foram feitas coproculturas por propriedade e as larvas de terceiro estágio (L3) foram identificadas e quantificadas. O DNA genômico foi obtido de amostras com 20.000 L3 por propriedade e utilizado em ensaios de qPCR com iniciadores específicos para as mutações F200Y, F167Y e E198A de *H. contortus* para determinar as frequências de alelos sensíveis e resistentes de cada SNP. Foi feita análise de correlação entre as práticas sanitárias e os dados de qPCR por meio do teste ANOVA. *Haemonchus* spp. foi o parasito mais predominante em 67% das propriedades. Foram detectadas frequências de alelos resistentes de até 72.0% para F200Y e de 23.8% para F167Y. Apenas alelos sensíveis foram detectados para E198A. Práticas de manejo associadas a alta frequência de resistência foram encontradas nesse estudo: alta frequência de tratamentos (média de 6x/ano; 15/18), cálculo de dose por estimativa visual de peso (15/18), ausência de consórcio com outros herbívoros (14/18), tratamento de todos os animais do rebanho (14/18), ausência de quarentena (10/18) e baixa adesão do método FAMACHA de avaliação seletiva (4/18). Esse é o primeiro estudo sobre práticas de manejo e detecção molecular da resistência para o BZ, em ovinos e caprinos no Paraná. Conclui-se que os SNPs F200Y e F167Y estão presentes em populações de *H. contortus* do oeste paranaense e várias práticas de manejo presentes nesses locais podem favorecer o desenvolvimento de resistência.

Palavras-chave: Haemoncose. Ovinos. Caprinos. Resistência Parasitária. qPCR. Polimorfismos.

ABSTRACT

Small ruminant farming has an important economic and social significance worldwide. Among the factors that can generate negative impacts on the health and welfare of these animals, infections by gastrointestinal helminths may be one of the most important and the agent *Haemonchus contortus* is the most pathogenic nematode. *H. contortus* is a hematophagous parasite capable of causing death in severe cases. The control of this helminth based on years of indiscriminate use of commercial anthelmintics has led to parasite selection for resistance. Because they are the oldest and most widely used, benzimidazoles (BZ) is one of the classes of anthelmintics most associated with this problem. Resistance to this class is associated with three single nucleotide polymorphisms (SNPs): F200Y, F167Y and E198A, in the isotype 1 of the beta-tubulin gene. Molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) allow the detection of these SNPs. The aim of this study was to determine the frequency of SNPs associated with BZ resistance in *H. contortus* isolated from 545 sheep and 124 goats from 18 farms in Western Paraná. Management practices that may be risk factors for the development of resistance in this region were identified. Fecal samples were collected from all animals, from properties distributed in eight municipalities: Foz do Iguaçu; Matelândia; Medianeira; Ramilândia; Santa Terezinha de Itaipu; São Miguel do Iguaçu; Serranópolis do Iguaçu and Vera Cruz do Oeste. The properties were georeferenced and the farmers answered a herd-health questionnaire. For each property, third stage larvae (L3) were obtained by fecal cultures and these larvae were identified and quantified using an optical microscope. Genomic DNA was obtained from 20.000 L3 and used in qPCR assays with specific primers for the mutations F200Y, F167Y and E198A of *H. contortus* to determine the frequencies of sensitive and resistant alleles of each SNP. Correlation analysis between health practices and qPCR data were performed using the ANOVA test. *Haemonchus* spp. was the most prevalent parasite in approximately 67% of the properties. Resistant allele frequencies of up to 72.0% were detected for the F200Y and 23.8% for the F167Y. Only sensitive alleles were detected for E198A. Management practices associated with anthelmintic resistance were found in this study: high frequency of treatments (average of 6x/year; 15/18), dose calculation by visual weight estimate (15/18), the absence of intercropping with other herbivores (14/18), treatment of all animals in the herd (14/18), absence of quarantine (10/18) and low adhesion of the FAMACHA method of selective evaluation (4/18). This is the first study on management practices and molecular detection of BZ resistance in sheep and goats in Paraná. It is concluded that the SNPs F200Y and F167Y are present in populations of *H. contortus* from Western Paraná and several management practices present in these farms can favor the development of resistance.

Keywords: Haemonchosis. Sheep. Goats. Parasitic resistance. qPCR. Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1 – NOME, SIGLA E ESTRUTURA QUÍMICA DOS BENZIMIDAZÓIS E PRÓ-BENZIMIDAZÓIS, UTILIZADOS EM PEQUENOS RUMINANTES. 30
- FIGURA 2 – FORMA DE LIGAÇÃO DOS BENZIMIDAZÓIS NA TUBULINA DE NEMATODAS. EM VERDE ESTÁ A ESTRUTURA O NÚCLEO BENZÊNICO DOS BENZIMIDAZÓIS, EM PRETO A PORÇÃO C-TERMINAL DA BETA-TUBULINA E EM CINZA A PORÇÃO N-TERMINAL DA BETA-TUBULINA..... 31
- FIGURA 3 – MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO GRUPO DOS BENZIMIDAZÓIS NO PARASITO *HAEMONCHUS CONTORTUS*. 36

CAPÍTULO II

- FIGURA 4 – PROPRIEDADES DE AMOSTRAGEM DE POPULAÇÕES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* DE OVINOS E CAPRINOS PARA O DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA AOS BENZIMIDAZÓIS NO ESTADO DO PARANÁ. 73

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO II

GRÁFICO 1 – RELAÇÃO DE CLASSES DE ANTI-HELMÍNTICOS E SEUS RESPECTIVOS REPRESENTANTES ADOTADAS POR 18 PRODUTORES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	78
GRÁFICO 2 – FREQUÊNCIA (%) DAS MUTAÇÕES F200Y E F167Y COM O NÚMERO DE TRATAMENTOS COM ANTI-HELMÍNTICOS POR ANO NAS PROPRIEDADES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ. O VALOR ZERO (0) REPRESENTA PROPRIEDADES SEM FREQUÊNCIA DE TRATAMENTOS.....	82
GRÁFICO 3 – CORRELAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA (%) DOS SNPs F200Y E F167Y COM A FORMA DE DOSAGEM DE ANTI-HELMÍNTICOS NAS PROPRIEDADES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	83

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

QUADRO 1 – HISTÓRICO DOS PRIMEIROS RELATOS DE RESISTÊNCIA ANTI- HELMÍNTICA DAS DROGAS DE DIFERENTES GRUPOS EM <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> , INCLUINDO O ANO DE COMERCIALIZAÇÃO, AUTOR(ES) E PAÍS DE REFERÊNCIA.	34
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1 – ÁREA TOTAL (KM ²), NÚMERO TOTAL DE HABITANTES, PRINCIPAL ATIVIDADE ECONÔMICA E POPULAÇÃO TOTAL DE OVINOS (O) E CAPRINOS (C) DE CADA UM DOS MUNICÍPIOS AMOSTRADOS.	73
TABELA 2 – INICIADORES (R = REVERSE; F = FORWARD) UTILIZADOS PARA DETECTAR OS SNPs F200Y, F167Y E E198A DE ALELO SENSÍVEL E RESISTENTE DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> E SEUS RESPECTIVOS TAMANHOS EM PARES DE BASES (PB).	76
TABELA 3 – DADOS DE FREQUÊNCIA (%) DAS MEDIDAS SANITÁRIAS ADOTADAS POR 18 PRODUTORES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.	79
TABELA 4 – NÚMERO DE ANIMAIS (O = OVINOS E C = CAPRINOS) AMOSTRADOS POR PROPRIEDADE E IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO E FREQUÊNCIA (%) DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS NA MICRORREGIÃO DE FOZ DO IGUAÇU.	79
TABELA 5 – MÉDIA DE C _{qs} DA qPCR E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs F200Y, F167Y E E198A DE AMOSTRAS DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EM FAZENDAS DE CRIAÇÃO DE OVINOS E CAPRINOS, DO OESTE DO PARANÁ.	80
TABELA 6 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA (%) E DESVIO PADRÃO (DP) DAS PRÁTICAS DE MANEJO SANITÁRIO PARA OVINOS E CAPRINOS, OBTIDAS POR MEIO DOS QUESTIONÁRIOS AOS PROPRIETÁRIOS E FREQUÊNCIAS DE ALELOS RESISTENTES DE F200Y, NO OESTE DO PARANÁ.	84
TABELA 7 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA (%) E DESVIO PADRÃO (DP) DAS PRÁTICAS DE MANEJO SANITÁRIO PARA OVINOS E CAPRINOS, OBTIDAS POR MEIO DOS QUESTIONÁRIOS AOS PROPRIETÁRIOS E FREQUÊNCIAS DE ALELOS RESISTENTES DE F167Y, NO OESTE DO PARANÁ.	85
TABELA 8 – FREQUÊNCIA (%) ALÉLICA MÉDIA DO SNP F200Y DE <i>HAEMONCHUS</i> spp. ENCONTRADAS EM RUMINANTES (N = AMOSTRAS),	

REALIZADAS COM VÁRIAS TÉCNICAS MOLECULARES EM DEMAIS ESTADOS DO BRASIL.....	88
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

L1 – Larvas de primeiro estágio

L2 – Larvas de segundo estágio

L3 – Larvas de terceiro estágio

L4 – Larvas de quarto estágio

BZ - Benzimidazóis

LVM - Levamisol

LM – Lactonas macrocíclicas

DAA – Derivados do amino-acetonitrilo

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

DNA – Ácido desoxirribonucleico

TRCOF – Teste de redução de contagem de ovos nas fezes

DL50 – Dose letal mediana

PCP - Reação em cadeia pela polimerase

PCR-RFLP - *Restriction fragment length polymorphism PCR*

qPCR – PCR em tempo real quantitativo

FA - Foz do Iguaçu

MA – Matelândia

ME – Medianeira

RM – Ramilândia

ST - Santa Terezinha de Itaipu

SM - São Miguel do Iguaçu

SI - Serranópolis do Iguaçu

VC - Vera Cruz do Oeste

ISE - *Inbred-Susceptible-Edinburgh isolate*

KOK - *Kokstad isolate*

SDS - *Sodium dodecil sufato*

EDTA – Ethilenodiamonotetraacetato

TE – Tris EDTA

HCl – Ácido clorídrico

Ct – *Threshold cycle*

g – Giro

s – Segundo

LISTA DE SÍMBOLOS

spp – Mais de uma espécie de um gênero

% - Porcentagem

β - Beta

°C – Graus celsius

μ L - Microlitro

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM – Milimolar

pH – Potencial hidrogeniônico

μ g – Micrograma

mg - Miligrama

M - Molar

pmol – Pico mol

ng – Nanograma

5' – Extremidade inicial da fita de DNA

3' – Extremidade final da fita de DNA

\geq - Maior ou igual a

\leq - Menor ou igual a

$>$ – Maior do que

$<$ – Menor do que

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
CAPÍTULO I	21
1 INTRODUÇÃO	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4.1 HELMINTOSES GASTRINTESTINAIS EM PEQUENOS RUMINANTES.....	26
4.2 <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	26
4.3 TRATAMENTO COM BENZIMIDAZÓIS	29
4.3.1 Estrutura química.....	30
4.3.2 Mecanismo de ação	31
4.3.3 Farmacologia	31
4.3.4 Rota de ação do albendazol na cutícula de <i>H. contortus</i>	33
4.4 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA	33
4.4.1 Resistência de <i>H. contortus</i> aos benzimidazóis.....	35
4.5 PRÁTICAS DE MANEJO E CONTROLE PARASITÁRIO	36
4.5.1 Refugia	36
4.5.2 Sistema semi-intensivo.....	37
4.5.3 Manejo de animais recém-adquiridos.....	37
4.5.4 Tratamento com um único grupo químico	38
4.5.5 FAMACHA	38
4.5.6 Rotação de pastagens.....	39
4.5.7 Consórcio de animais.....	40
4.5.8 Falhas de Manejo e sua influência na seleção de resistência às drogas	40
4.6 DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA.....	41
4.6.1 Técnicas fenotípicas <i>in vivo</i>	42
4.6.1.1 Teste controlado de eficácia	42
4.6.1.2 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF)	42
4.6.2 Técnicas fenotípicas <i>in vitro</i>	42
4.6.2.1 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)	43

4.6.2.2	Teste de desenvolvimento larvar (TDL)	43
4.6.3	Técnicas genotípicas/moleculares	43
4.6.3.1	PCR convencional	44
4.6.3.2	Nested-PCR	45
4.6.3.3	PCR alelo-específico	45
4.6.3.4	PCR-RFLP.....	45
4.6.3.5	ARMS-PCR.....	46
4.6.3.6	qPCR	46
4.6.3.7	Nemabiome: uma nova biologia molecular na Parasitologia.....	47
4.7	DIAGNÓSTICO MOLECULAR E PRÁTICAS DE MANEJO ASSOCIADAS A RESISTÊNCIA PARASITÁRIA NO BRASIL	48
4.8	RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM PEQUENOS RUMINANTES NO PARANÁ.....	51
4.9	CONSIDERAÇÕES SOBRE O CAPÍTULO I	51
5	REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO II	67	
AVALIAÇÃO DE PRÁTICAS SANITÁRIAS E DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA BETA-TUBULINA EM POPULAÇÕES DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> COLETADOS NO OESTE DO PARANÁ, BRASIL	67	
1 RESUMO.....	68	
2 ABSTRACT	68	
3 INTRODUÇÃO	69	
4 MATERIAL E ÁREA DE ESTUDO	72	
4.1	AMOSTRAGEM.....	72
4.2	QUESTIONÁRIO SANITÁRIO APLICADO AOS PRODUTORES	73
4.3	COLETA DE FEZES E COPROCULTURA.....	74
4.4	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DAS L3	75
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA	75
4.6	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)	76
4.7	ANÁLISE DE DADOS DA qPCR.....	76
4.8	ESTATÍSTICA DESCRITIVA E CORRELAÇÃO DOS DADOS DO MANEJO E DA qPCR	77
5 RESULTADOS	77	
5.1	PRÁTICAS DE MANEJO E CONTROLE PARASITÁRIO NO REBANHO	77
5.2	FREQUÊNCIA MÉDIA DE GÊNEROS DE NEMATODAS	79

5.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)	80
5.4 ESTATÍSTICA DESCRITIVA E CORRELAÇÃO DO MANEJO E DA qPCR.....	81
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO.....	90
8 REFERENCIAS	90
CAPÍTULO III	95
1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
1.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
REFERÊNCIAS GERAIS	96
ANEXO 1 – CERTIFICADO DA CEUA	111
ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PRODUTORES.....	112
ANEXO 3 – DADOS DOS QUESTIONÁRIOS SANITÁRIOS.....	113

INTRODUÇÃO GERAL

Este estudo apresenta-se dividido em três capítulos.

No Capítulo I foi abordado uma introdução geral e a justificativa do estudo, seguida pelos objetivos. Por fim, uma revisão de literatura, que abordou os principais aspectos sobre helmintoses gastrintestinais, *Haemonchus contortus*, formas de controle e tratamento da haemoncose, histórico da resistência parasitária no mundo, mecanismos moleculares associados a resistência aos benzimidazóis (BZ), descrição de métodos diagnósticos com foco nessa problemática e um histórico de estudos que avaliaram a resistência parasitária no Brasil e no Paraná.

No Capítulo II, foi apresentado um estudo inédito sobre a detecção molecular dos polimorfismos associados à resistência de *H. contortus* aos BZ no Paraná e a realização de um levantamento sobre manejo sanitário nas propriedades avaliadas.

No Capítulo III encontram-se as considerações finais e perspectivas futuras.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes possui grande importância econômica e social no mundo todo. De acordo com o último censo agropecuário, o Brasil possui um rebanho estimado de 19 milhões de ovinos e de 11 milhões de caprinos, distribuídos em mais de 500 mil e 300 mil estabelecimentos, respectivamente. Nesse contexto, o Estado do Paraná (PR) representa, aproximadamente 3% do rebanho ovino e 1% do rebanho caprino. No Brasil, o PR é o 8º e 9º maior criador de ovinos e caprinos, respectivamente (IBGE, 2019). A produção de ovinos e caprinos no PR possui um perfil de exploração com base na agricultura familiar, com rebanhos não muito grandes e é organizada em sistemas de cooperativismo (IDR-PARANÁ). A produção de carne de ovinos e caprinos é destinada em quase sua totalidade ao consumo interno. A ovinocultura apresenta o 5º maior número de estabelecimentos no Paraná (IBGE, 2017) e no ano de 2020 a ovinocultura movimentou aproximadamente R\$ 96 milhões no Estado (PÁRANA, 2021).

Dentre os fatores que mais geram impactos negativos na saúde e no bem-estar de pequenos ruminantes, as infecções por helmintos gastrintestinais são as mais relevantes. Além disso, essas infecções causam perdas financeiras significativas aos produtores ao provocarem redução no ganho de peso (BENAVIDES et al., 2016), na produção de leite e carne (LUO et al., 2017), e alta mortalidade (MOLENTO et al., 2013). Tais infecções, podem ser associadas a múltiplos agentes, dos quais os de maior frequência são: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia curticei*, *Oesophagostomum columbianum* e *Teladorsagia circumcincta* (AMARANTE et al., 2004). Contudo, o nematoda *H. contortus* é o parasito de maior prevalência e patogenicidade, infectando ruminantes, particularmente ovinos e caprinos, todos os anos (BRASIL et al., 2012). Localizado no abomaso dos ruminantes, esse helminto se alimenta de sangue dos capilares da mucosa do órgão. O parasito é capaz de provocar inúmeros sinais clínicos em seus hospedeiros, com maior destaque para a anemia e o edema submandibular e em casos severos pode levar o animal ao óbito (SCHWARZ et al., 2013). *H. contortus* foi o primeiro estrongilídeo de importância veterinária a ser sequenciado (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013) e desde então, estudos com foco na compreensão de fatores associados ao parasito, como seu desenvolvimento e interação parasito-hospedeiro (GODOY et al., 2016; WANG et al., 2019) e o desenvolvimento de

métodos de controle de próxima geração (vacinas) (SALLÉ et al., 2018; MOHANDAS et al., 2016) trouxeram vários avanços.

Desde a década de 60, com o lançamento do tiabendazole no mercado, o controle da haemoncose nos rebanhos, tem como base a utilização de drogas anti-helmínticas. Várias classes de anti-helmínticos foram desenvolvidas desde então. Contudo, medicamentos da classe dos benzimidazóis (BZ) são utilizados no mundo todo (KRÍZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011). O uso intensivo desses compostos, associado a características intrínsecas de *Haemonchus* spp., como o alto fluxo gênico, sua notável diversidade genética e um alto tamanho efetivo entre as populações (fêmeas de *H. contortus* produzem até 10.000 ovos), desencadearam evidências concretas de resistência desse parasito no Brasil e no mundo (WILLIAMSON et al., 2011). Três mutações já foram associadas à resistência aos BZ e estão presentes no isotipo 1 do gene que codifica a beta-tubulina. As duas primeiras mutações estão relacionadas à mudança da codificação do aminoácido fenilalanina em tirosina (TTC para TAC) nos códons 200 e 167 (F200Y e F167Y) e a terceira, à mudança de glutamato em alanina (GAA para GCA) no códon 198 (E198A) (BARRÈRE et al., 2013).

Com a propagação de parasitos resistentes, tornou-se crucial o entendimento dos mecanismos da resistência (químicos e moleculares) e quais fatores associados ao manejo poderiam contribuir para o estabelecimento da mesma. Além disso, como o desenvolvimento de uma nova droga anti-helmíntica é um processo oneroso e muito lento em comparação com a velocidade de surgimento de resistência, torna-se essencial a busca por alternativas eficientes de controle, com menor uso de fármacos (VERÍSSIMO et al., 2012). Também se deve levar em consideração, o custo do tratamento para as helmintoses que, associado com todos os outros fatores citados, são limitantes para a expansão da ovino e caprinocultura (MOLENTO et al., 2013).

Algumas práticas de manejo estratégico que visam a manutenção da refúgia usadas em associação aos anti-helmínticos, podem retardar o aumento da resistência parasitária nos rebanhos (COSTA et al., 2011). Mas como ponto-chave no controle e prevenção da resistência anti-helmíntica, algumas formas de diagnóstico são ferramentas essenciais. Vários testes fenotípicos e genotípicos foram padronizados para a detecção da resistência aos BZ. Porém, é de conhecimento que testes fenotípicos *in vivo* e *in vitro*, não possuem a sensibilidade necessária para a detecção precoce da resistência (HUMBERT et al. 2001). Como o mecanismo molecular da resistência aos BZ é um dos mais compreendidos, o uso de testes genotípicos permite uma detecção mais sensível da resistência, a nível de 1% nas

populações e, consequentemente, promover ações mais eficazes contra o avanço da mesma (ELMAHALAWY et al., 2018).

No Brasil, estudos com foco na detecção molecular da resistência aos BZ já foram feitas nos Estados de São Paulo (SP) (NICIURA et al., 2012; BRASIL et al., 2012; NUNES et al., 2013; ISHII et al., 2017), Minas Gerais (MG) (BRASIL et al., 2012; NUNES et al., 2013), Santa Catarina (SC) (BRASIL et al., 2012; ISHII et al., 2017), Ceará (CE) (SANTOS et al., 2014; 2017), Pará (PA) (CHAGAS et al., 2016) e Bahia (BA) (LAMBERT et al., 2017). Fávero et al. (2020) investigaram a frequência dos SNPs F167Y, F200Y e E198A em *H. contortus* e *H. placei* em propriedades de bovinos dos Estados de Rondônia, PA, Tocantins, Maranhão, Alagoas, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (MS), MG, SP, PR e Rio Grande do Sul (RS). Contudo, frequência de alelos resistentes para os três SNPs só foi detectado no PA, MS e RS.

No PR, Ishii et al. (2017) detectou, por meio de PCR convencional e sequenciamento, a presença de genótipos resistentes do SNP F167Y em todas as amostras de ciatostomíneos de equinos. Além disso, encontrou uma nova mutação no códon 172, resultante da substituição de uma serina para tirosina em 17.9% das amostras. Em pequenos ruminantes, a detecção da resistência aos BZ por métodos fenotípicos já foi realizada (THOMAZ-SOCCOL et al., 1996, 2004; CUNHA-FILHO et al., 1998; VILA NOVA et al., 2014), contudo, o diagnóstico molecular da resistência aos BZ em ovinos e caprinos ainda não foi determinado no PR.

2 JUSTIFICATIVA

As infecções por helmintos gastrintestinais associadas com a resistência múltipla, são fatores que impactam diretamente na qualidade de vida e produção de pequenos ruminantes. Os BZ são uma das classes de anti-helmínticos mais empregadas no controle dessas afecções e pesquisas demonstraram que a resistência contra essa droga já está presente em rebanhos no mundo todo.

No PR, estudos feitos por Thomaz-Soccol et al. (1996 e 2004), Cunha-Filho et al. (1998) e Vila Nova et al. (2014), determinaram algumas características de manejo e avaliaram a resistência parasitária por meio do teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF). Contudo, com exceção do estudo de Ishii et al. (2017) que detectou a presença do SNP F167Y em larvas de ciatostomíneos resistentes ao BZ isoladas de equinos em 67 amostras de Tijucas do Sul, o diagnóstico molecular associado a resistência aos BZ ainda não foi elucidado em ruminantes no PR. Logo, torna-se necessário um estudo que permita tais esclarecimentos, com foco no alerta sobre o risco genético (alta seleção) e na possibilidade de sugerir estratégias seletivas para o controle (alta diluição), das helmintoses gastrintestinais em pequenos ruminantes da microrregião de Foz do Iguaçu no PR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os polimorfismos associados à resistência parasitária aos BZ em *H. contortus* isolados de pequenos ruminantes e identificar práticas de manejo sanitário feitas em propriedades rurais da região Oeste do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de criação de ovinos na microrregião de Foz do Iguaçu.
- Definir fatores de risco e de proteção de práticas de manejo sanitário, para a seleção de parasitos resistentes.
- Determinar as frequências de alelos sensíveis e resistentes dos SNPs F200Y, F167Y e E198A no isotipo 1 do gene que codifica a beta-tubulina de populações de *H. contortus* isoladas de ovinos e caprinos no Oeste do Estado do Paraná.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HELMINTOSES GASTRINTESTINAIS EM PEQUENOS RUMINANTES

Pequenos ruminantes podem ser parasitados simultaneamente por várias espécies de nematodas. Os helmintos de maior frequência são *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia curticei*, *Oesophagostomum columbianum* e *Teladorsagia circumcincta* (AMARANTE et al., 2004). Dentre todos, *H. contortus* é o parasito de mais relevância e é responsável pelas infecções mais patogênicas além de possuir, em casos severos, altas taxas de mortalidade (NGUYEN et al., 2019). *Trichostrongylus colubriformis* possui grande distribuição mundial e as infecções por esse helminto são caracterizadas por hemorragia, edema e hipoproteïnemia. Em casos severos, ocorre perda de peso nos animais, como consequência da grave apatia e diarreia (PAPADOPOULOS et al., 2012).

Parasitos do gênero *Cooperia*, são responsáveis por quadros de anorexia, atrofia de vilosidade, diarreia e redução de ganho de peso quando em grande quantidade no hospedeiro. Contudo, estão presentes em menor frequência em pequenos ruminantes, sendo associados de maneira geral a infecções em rebanhos bovinos (VERSCHAVE et al., 2016; CRAIG, 2018). De forma similar, helmintos do gênero *Oesophagostomum* também são associados a infecções em bovinos. Entretanto, em ovinos e caprinos também possuem alta prevalência e patogenicidade podendo causar diarreia e danos severos ao intestino (DALAL et al., 2015). Além disso, possuem como característica interessante a capacidade de formar nódulos, o que aparentemente reduz a exposição das larvas aos anti-helmínticos (CRAIG, 2018) e reflete em menor pressão de seleção de parasitos resistentes. Infecções por *Teladorsagia*, quando o nível de pH do abomaso atinge 6, provocam diarreia devido a não ativação do pepsinogênio. Com um pH de 7, ocorre diarreia, descamação da mucosa e invasão bacteriana da parede do abomaso. Infecções por esse parasito originam um quadro clínico similar ao de *T. colubriformis*, mas encontram-se em menor distribuição no mundo (CRAIG, 2018).

4.2 HAEMONCHUS CONTORTUS

Como relatado acima, ovinos e caprinos são suscetíveis a infecções por múltiplos nematodas gastrintestinais, porém, o agente etiológico *H. contortus* é o mais patogênico (LAING et al., 2013). Pertencente a superfamília Trichostrongyloidea, o parasito caracteriza-se por ser um verme cilíndrico, delgado e de respiração aeróbia (VIEIRA et al., 2009). O

adulto mede cerca de 1,0 a 3,0 cm de comprimento. O macho possui bolsa copuladora bem desenvolvida, com lobo dorsal assimétrico e espículos com forma de gancho. Nas fêmeas, observam-se ovários brancos ao redor do intestino, com papilas cervicais. Machos e fêmeas possuem uma lanceta perfurante que auxilia na sua alimentação de sangue da mucosa do abomaso (LICHTENFELS et al., 1994).

O ciclo biológico desse helminto é monoxeno, com uma fase de vida livre que ocorre no meio ambiente, e uma parasitária, que se desenvolve no animal. *Haemonchus contortus* é transmitido ao hospedeiro por via oral passiva por meio de pastagens contaminadas com larvas do parasito. O ciclo de vida é de aproximadamente 3 semanas, dependendo da temperatura e pluviosidade. A primeira fase inicia-se com a eliminação de ovos não embrionados nas fezes do hospedeiro. Por volta de 10 h no ambiente, o embrião cresce até três vezes o seu tamanho inicial com muitas divisões celulares. Após 12 h, o crescimento cessa, mas o embrião exibe maior atividade e o desenvolvimento continua. Com 26 °C e 100% de umidade, o embrião leva cerca de 14 a 17 h para eclodir e se desenvolver em larvas de primeiro estágio (L1). Em aproximadamente mais cinco dias, a L1 sofre duas mudas e evolui para larvas de terceiro estágio (L3) (forma infectante). A L3 migra do bolo fecal para a pastagem, onde é ingerida de forma passiva pelos animais, juntamente com a forragem. No hospedeiro, ela perde a bainha e após migrar e invadir a mucosa do abomaso, torna-se larva de quarto estágio (L4), com altos níveis de CO₂ no órgão. Em seguida, a L4 evolui para adultos dioicos. Adultos de ambos os sexos se alimentam de sangue e as fêmeas ingerem até 12 µL por dia. Fêmeas e machos copulam e as fêmeas adultas começam a ovipostura 18 dias após a infecção e podem estar completamente grávidas após o 30º dia (ASHRAF; PRICHARD, 2014; PRESTON et al., 2016).

Por ser um parasito hematófago, é capaz de provocar em seus hospedeiros anemia além de perda de peso, pelos arrepiados e sem brilho, hipoproteinemia, grave gastrite hemorrágica, edema na região submandibular e ventral, e em casos severos, pode levar a morte, inclusive de animais adultos (SCHWARZ et al., 2013). Fatores como alta carga parasitária, associada com a elevada fecundidade da fêmea adulta, que chega a produzir até 10.000 ovos/dia, e a condições ambientais favoráveis de temperatura e pluviosidade, o parasito pode desencadear surtos devastadores de haemoncose no rebanho (LAING et al., 2013).

H. contortus é altamente eficiente em sua capacidade de evadir a ação dos anti-helmínticos, que constituem a base do seu controle. Esse fator pode ser explicado por um fluxo gênico muito alto entre as populações, notável diversidade genética e alto tamanho

efetivo da população, o que aumentou a variabilidade dentro da espécie (BALTRUŠIS et al., 2018). Esses fatores, que estão ligados a adaptação desse parasito, com sua plasticidade, possibilitam a ocorrência de muitas mutações no genoma de bilhões de descendentes desse helminto. Em consequência a essa grande variabilidade genética, surgem constantemente novas mutações sobre as quais a pressão de seleção pode atuar (GILLEARD; REDMAN, 2016).

H. contortus foi ainda o primeiro estrongilídeo de importância veterinária a ser sequenciado. A disponibilidade dessas sequências de genoma completo (LAING et al., 2013; SCHWARZ et al., 2013), abriu caminho para avanços substanciais em diversas áreas da biologia do parasito, tais como a maquinaria genética envolvida no desenvolvimento do ciclo de vida, reprodução e interação parasito-hospedeiro (PALEVICH et al., 2019). Esses dados forneceram um recurso importante para a elucidação das características genéticas de *Haemonchus* spp. relacionadas à suscetibilidade, controle das fases do ciclo de vida e, com isso, o desenvolvimento de intervenções de próxima geração, como novos medicamentos, vacinas e testes diagnósticos (PRESTON et al., 2016).

Com a publicação do genoma completo de *H. contortus*, vários estudos vêm sendo conduzidos para compreensão dessas características genéticas. Em estudo feito por Godoy et al. (2016), os autores avaliaram a interação da ivermectina (IVM) e moxidectina (MOX) com a fosfo-glicoproteína (P-gp) de *H. contortus*. Foi caracterizada a função de transporte da P-gp e sua localização em parasitos adultos. Com isso, foi determinada sua interação pronunciada com a IVM, em comparação com a MOX. Esse dado indica um possível envolvimento desses transportadores no efluxo e eliminação desses fármacos de tecidos-chave, como o útero e trato digestivo, o que contribui para a resistência contra as lactonas macrocíclicas (LM) em *H. contortus*. Wang et al. (2019), caracterizaram o secretoma de fases de vida de *H. contortus*. O secretoma inclui proteínas, carboidratos e lipídios que são liberados pelo trato alimentar do parasito, por meio de glândulas excretoras ou a partir da superfície cuticular e que mantém uma relação imunológica com o hospedeiro (WANG et al., 2019). Nesse estudo, determinou-se que o secretoma desse parasito sofreu mudanças durante suas fases de vida, sugerindo uma adaptação constante aos diferentes ambientes, fora e dentro do hospedeiro.

A compreensão das interações parasito-hospedeiro e parasito-parasito, cria uma base para a descoberta de novos alvos terapêuticos e/ou vacinais. Sallé et al. (2018) compararam o transcriptoma de populações de *H. contortus* isolados de ovelhas vacinadas com a Barbevax, a primeira vacina contra *H. contortus* comercializada no mundo. Os antígenos da Barbevax são proteínas de membrana (proteases) isoladas das células intestinais do parasito adulto. Foi

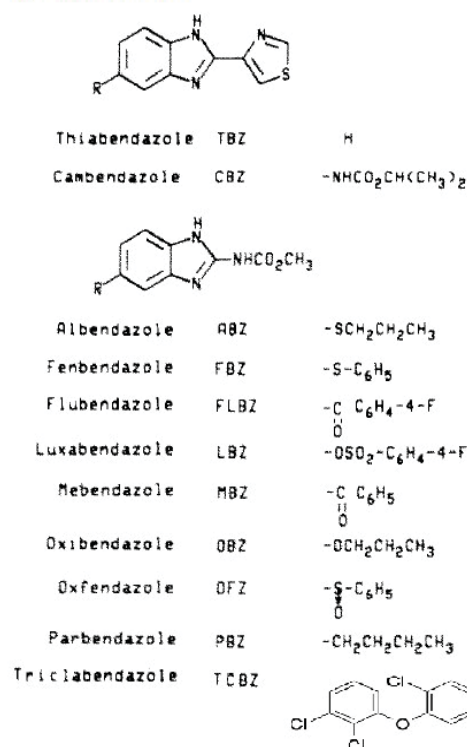
determinado que os parasitos sobreviventes de animais vacinados tiveram aumento da expressão de outras proteases e de reguladores do tráfego de lisossomas, habilidades que podem contornar o efeito da vacina. Mohandas et al. (2015) definiram o complemento das aminopeptidases da família M1, estabeleceram suas relações filogenéticas e exploraram os perfis de transcrição de seus genes nos principais estágios de desenvolvimento de *H. contortus*. Análises comparativas sugeriram que as aminopeptidases avaliadas podem desempenhar papéis na digestão, excreção de metabólitos, regulação osmótica, divisão celular, função gonadal e desenvolvimento e reprodução do parasito. Esses resultados podem orientar explorações moleculares dessas peptidases e avaliações de formas recombinantes de aminopeptidases imunogênicas para uma nova vacina contra haemoncose.

4.3 TRATAMENTO COM BENZIMIDAZÓIS

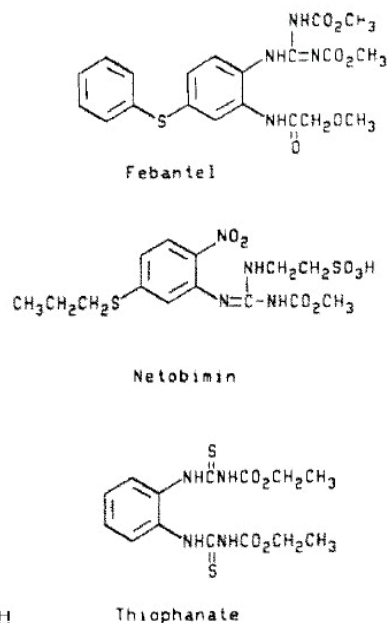
Desde sua introdução no mercado na década de 1960 (BROWN et al., 1961), os BZ são a classe de anti-helmínticos de amplo-espectro mais utilizada no controle das infecções por nematodas gastrintestinais em pequenos ruminantes. Esses compostos são classificados em tiazólicos (tiabendazol, cambendazol), metilcarbamatos (albendazol - ABZ, fembendazol, flubendazol, luxabendazol, mebendazol, oxibendazol, oxfendazol, parbendazol), halogenados (triclabendazol) e pró-benzimidazóis (febantel, netobimina, tiofanato) (LACEY, 1988) (FIGURA 1). Os pró-benzimidazóis são pró-drogas inativas que são convertidas metabolicamente para moléculas com atividade anti-helmíntica ativa no hospedeiro. Os BZ metilcarbamatos são as bases mais usualmente utilizadas (LANUSSE et al., 2016).

FIGURA 1 – NOME, SIGLA E ESTRUTURA QUÍMICA DOS BENZIMIDAZÓIS E PRÓ-BENZIMIDAZÓIS, UTILIZADOS EM PEQUENOS RUMINANTES.

a) Benzimidazóis



b) Pró-benzimidazóis

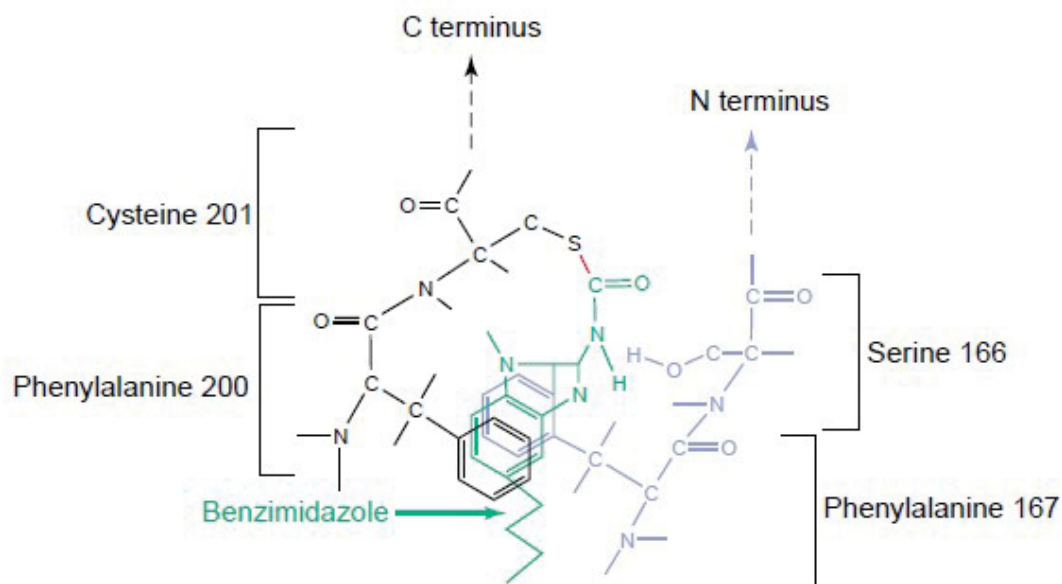


FONTE: Adaptado de LACEY (1988).

4.3.1 Estrutura química

Os BZ possuem pré-requisitos estruturais para sua ligação na tubulina. A protonação e/ou desprotonação são importantes para o transporte de drogas através das membranas e a porção carbamato é essencial para a interação com a beta-tubulina (PRICHARD, 2001). As cadeias laterais alifáticas são essenciais para uma oxidação microsomal mais eficiente em comparação com sistema de anéis aromáticos. Além disso, enxofre, em vez de oxigênio, como uma ponte entre a cadeia lateral e o núcleo benzênico, melhora as propriedades farmacocinéticas da droga (PRICHARD, 2001). O núcleo benzênico dos BZ interage com a fenilalanina na posição 200 da beta-tubulina no C-terminal e com a fenilalanina na posição 167 N-terminal. O carbamato forma uma ligação covalente com a cisteína 201 no C-terminal e na serina 166 no N- terminal (PRICHARD, 2001) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – FORMA DE LIGAÇÃO DOS BENZIMIDAZÓIS NA TUBULINA DE NEMATODAS. EM VERDE ESTÁ A ESTRUTURA O NÚCLEO BENZÊNICO DOS BENZIMIDAZÓIS, EM PRETO A PORÇÃO C-TERMINAL DA BETA-TUBULINA E EM CINZA A PORÇÃO N-TERMINAL DA BETA-TUBULINA.



FONTE: Adaptado de PRICHARD (2001).

4.3.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação dos BZ consiste na ligação desses com a subunidade beta da tubulina, uma proteína monomérica e solúvel que constitui a estrutura básica dos microtúbulos. Ao se ligar de forma reversível no lugar da colquicina, os BZ atuam bloqueando a dimerização da subunidade beta e, conseqüentemente, interferem na polimerização dos microtúbulos (LACEY, 1988). Microtúbulos são vitais para a sobrevivência de células eucariotas e possuem funções intracelulares críticas, como a formação do citoesqueleto, transporte intracelular, secreção celular, absorção de nutrientes, motilidade e divisão celular. Logo, ao interferir na polimerização, os BZ ocasionam paralisia, movimento descordenado e alteração da morfologia, levando os helmintos à morte por perda da homeostase celular (WHITTAKER et al., 2017).

4.3.3 Farmacologia

A atividade farmacológica dos BZ é baseada na ligação com a beta-tubulina do parasito o que provoca a desestabilização do equilíbrio dinâmico dos microtúbulos (LACEY, 1988). Com isso, todas as funções associadas aos microtúbulos a nível de célula são alteradas

e os parasitos são eliminados do abomaso por incapacidade de manter sua homeostase. Adultos de *H. contortus* podem ser capazes de sobreviver por um curto período de tempo após o tratamento, mas se a deficiência das funções essenciais é estendida por um tempo suficientemente longo, a capacidade do parasito de permanecer no abomaso é afetada. Com o auxílio do trânsito intestinal, parasitos adultos são facilmente expelidos do lúmen do intestino (LANUSSE et al., 2016).

Dentro de ruminantes, a dissolução dos BZ metilcarbamatos, quando administrados por via oral ou intraruminal (IR), ocorre principalmente no abomaso, favorecida pelo baixo pH. Logo após a administração, os BZ são quase completamente adsorvidos no conteúdo intestinal (HENNESSY, 1993). O rúmen atua como um reservatório de drogas, por diminuir o tempo de trânsito do conteúdo intestinal, o que resulta na melhor disponibilidade sistêmica dos compostos BZ, como consequência da maior dissolução de partículas da droga no abomaso (LANUSSE; PRICHARD, 1993). A droga dissolvida no fluido intestinal está disponível para absorção e/ou difusão através da cutícula de *H. contortus*. Assim, *H. contortus* é amplamente exposto as moléculas livres das drogas dissolvidas, não adsorvidas pelo conteúdo intestinal, disponíveis no conteúdo gastrointestinal e a droga presente nas secreções gástricas. Como *H. contortus* é um parasito que se alimenta de sangue, também pode ser exposto a medicamentos disponíveis por meio da corrente sanguínea (ALVAREZ et al., 2000).

Para os tratamentos por via oral, recomenda-se jejum alimentar prévio por 12 h, com oferta de água *ad libitum*. Uma vez que os BZ são administrados principalmente por via oral, o metabolismo de “primeira passagem” é relevante no comportamento cinético destes compostos. Derivados de BZ aromáticos, como fembendazol e oxfendazol, necessitam de metabolismo oxidativo hepático mais extenso do que derivados alifáticos (ABZ e sulfóxido de ABZ) para atingir polaridade suficiente para excreção (HENNESSY, 1993). Consequentemente, enquanto baixas concentrações de fembendazol são encontradas no plasma após sua administração oral/IR em ovinos e bovinos, o ABZ não é detectado na corrente sanguínea após sua administração parenteral em ambas as espécies (LANUSSE et al., 2016).

A biotransformação dos BZ ocorre predominantemente no fígado, embora a atividade metabólica seja aparente em tecidos extra-hepáticos, como o parênquima pulmonar e a mucosa do intestino delgado (VIRKEL et al., 2004). Portanto, o sulfóxido de ABZ e oxfendazol podem ser reduzidos de volta ao seus respectivos tioéteres pela microbiota intestinal e ruminal e podem atuar como fonte de ABZ e fembendazol, respectivamente, no

trato gastrointestinal. A alta eficácia do sulfóxido de ABZ e oxfendazol contra *H. contortus* depende, em parte, dessa redução bacteriana do sulfóxido para tioéteres mais farmacologicamente ativos (LANUSSE; PRICHARD, 1993). Na verdade, embora o ABZ não seja detectado na corrente sanguínea, ele é detectado em altas concentrações na mucosa abomasal e dentro de *H. contortus* recuperados de ovelhas tratadas (ALVAREZ et al., 2000).

4.3.4 Rota de ação do albendazol na cutícula de *H. contortus*

Drogas anti-helmínticas podem atingir *H. contortus* por ingestão oral de sangue e por captação/difusão transcuticular. Portanto, a concentração da droga ativa na corrente sanguínea, após ingestão oral e/ou na mucosa/líquido abomasal, por difusão transcuticular é relevante para a eficácia clínica contra esse parasito (LANUSSE et al., 2016).

A presença de lipídios na cutícula do parasito permite a passagem apenas de moléculas suficientemente pequenas pela matriz de colágeno da cutícula (HO et al., 1992). A lipofilicidade facilita a difusão da droga através da cutícula em nematodas (HO et al., 1992) assim drogas lipofílicas como o ABZ possuem uma maior capacidade de atravessar a superfície externa do nematóide. Com isso, apesar das concentrações mais baixas de ABZ no fluido abomasal, sua alta lipofilicidade pode aumentar a penetração através da superfície externa do parasito. Dessa forma, descata-se a relevância do processo de difusão transcuticular, mesmo em um parasito hematófago como *H. contortus*, onde a maior lipofilicidade do ABZ é responsável por seu maior efeito (MOTTIER et al., 2003).

4.4 RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

O uso indiscriminado de anti-helmínticos gerou o problema da resistência parasitária em animais domésticos no mundo todo (ESTEBAN-BALLESTEROS et al., 2017). Os primeiros relatos de resistência em *H. contortus* datam da década de 60 (QUADRO 1).

QUADRO 1 – HISTÓRICO DOS PRIMEIROS RELATOS DE RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA DAS DROGAS DE DIFERENTES GRUPOS EM *HAEMONCHUS CONTORTUS*, INCLUINDO O ANO DE COMERCIALIZAÇÃO, AUTOR(ES) E PAÍS DE REFERÊNCIA.

Classe	Droga	Comercialização	Referência	País
Benzimidazoles	Thiabendazol	1961	Drudge et al. (1964)	EUA
	Parbendazol	1966	Berger (1975)	África do Sul
	Fembendazol	1971	Berger (1975)	África do Sul
	Mebendazol	1971	Berger (1975)	África do Sul
	Albendazol	1979	Gunawan et al. (1979)	Austrália
	Oxfendazol	1975	Webb; McCully (1979)	Austrália
Salicilanilidas	Rafoxanide	-	Van Wyk; Gerber (1980)	África do Sul
	Closantel	1982 Austrália	Van Wyk et al. (1982)	África do Sul
Organofosforados	Naphthalophos	1960	Green et al. (1981)	Austrália
Imadazotiazoles	Levamisol	1965 (1968 Austrália)	Green et al. (1981)	Austrália
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	1981	Carmichael et al. (1987)	África do Sul
	Abamectina	1985	Wooster et al. (2001)	Austrália
	Moxidectina	1992	Vickers et al. (2001)	Nova Zelândia
	Doramectina	1993	Terrill et al. (2001)	USA
	Eprinomectina	1996	Scheuerle et al. (2009)	Suíça
Derivados do amino-acetonitrilo	Monepantel	2010 América do Sul	Mederos et al. (2014)	Uruguai

FONTE: KOTZE; PRICHARD (2016).

A resistência anti-helmíntica pode ser definida, como a diminuição ou a perda de eficácia de uma droga contra os parasitos, mesmo quando utilizada na dose que se mostrou comprovadamente letal, para a maioria dos indivíduos da mesma espécie (WOOD et al., 1995). A seleção parasitária é um processo evolutivo artificial, onde indivíduos que sobrevivem ao tratamento transmitem características, inicialmente fenotípicas e depois genotípicas, para a próxima geração, o que, em subseqüentes gerações e curto tempo, torna maior a frequência de indivíduos resistentes dentro da população (BLACKHALL et al., 2008). Consequentemente, torna-se necessário o entendimento da genética e mecanismos subjacentes à resistência aos anti-helmínticos para desenvolver novos métodos para o controle das infecções (BRASIL et al., 2012).

A resistência anti-helmíntica, na maioria dos casos, é aceita como um fenômeno pré-adaptativo em que os genes responsáveis pela resistência já existem, em baixa frequência, dentro da população, mas se tornam dominantes com a pressão de seleção feita com o uso frequente e a longo prazo dos fármacos (TURNBULL et al., 2018). Podem ser atribuídos à resistência, inúmeros fatores genéticos que incluem, por exemplo, alterações qualitativas e quantitativas nos alvos das drogas presentes nos parasitos, o que torna uma população antes suscetível em resistente (MATÉ et al., 2018).

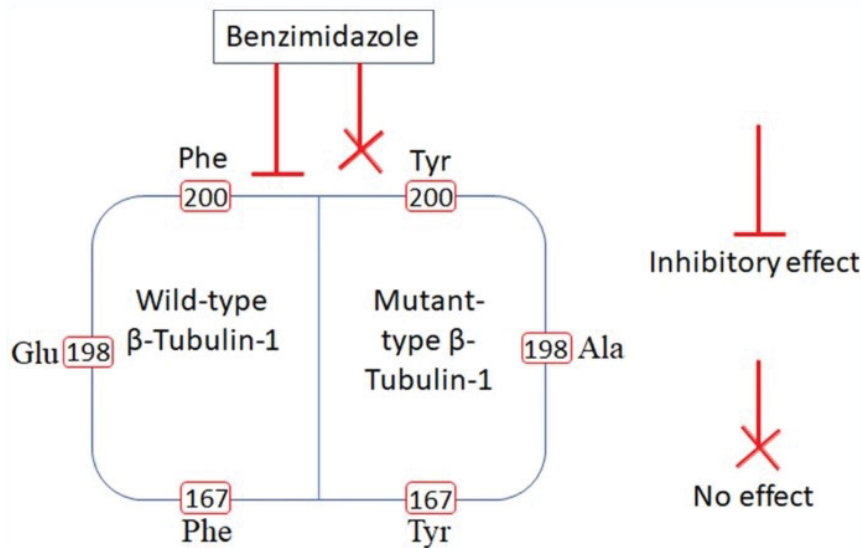
Em adição a condição genética, a seleção de parasitos pode ser influenciada por práticas de manejo na propriedade. Logo, informações sobre a epidemiologia e os fatores de

risco e de proteção relacionados a essas práticas tornam-se relevantes para a prevenção e controle efetivo dos parasitos, visto que, tais dados podem ajudar a formular medidas que previnam ou retardem o aparecimento da resistência (NICIURA et al., 2012; VERÍSSIMO et al., 2012).

4.4.1 Resistência de *H. contortus* aos benzimidazóis

A resistência de *H. contortus* aos BZ é um dos mecanismos mais bem compreendidos na área da parasitologia veterinária (BARRÈRE et al., 2012). Estudos *in vitro* com concentrações crescentes de BZ mostraram que a seleção para indivíduos resistentes de *H. contortus* ocorre dentro de poucas gerações (KWA et al., 1995). A resistência a essa classe de fármaco é monogênica e é caracterizada por mutações no isotipo 1 do gene que codifica a beta-tubulina. Essas mutações geram alterações nos aminoácidos que formam os microtúbulos, dificultando a ligação dos BZ ao seu local de ação, que é a subunidade beta da tubulina (MOTTIER; PRICHARD, 2008). Em *H. contortus* três dessas mutações já foram descritas: no códon 200, no códon 167 e no códon 198. As duas primeiras mutações estão relacionadas a mudança da codificação do aminoácido fenilalanina em tirosina (F200Y e F167Y) e a terceira a mudança de glutamato em alanina (F198A) (FIGURA 3) (BARRÈRE et al., 2013). A mutação F200Y é a mais comum e encontra-se presente na maioria das localizações geográficas (BRASIL et al., 2012; NICIURA et al., 2012; BARRÈRE et al., 2012, 2013; SANTOS et al., 2014; REDMAN et al., 2015; CHAUDHRY et al., 2015), enquanto que a F167Y é menos comum, contudo apresenta maior frequência que o primeiro em determinadas regiões (SILVESTRE; CABARET, 2002; SANTOS et al., 2014). O SNP E198A é o mais raro entre os três polimorfismos e ocorre com maior frequência em algumas regiões da Índia (CHAUDHRY et al., 2015).

FIGURA 3 – MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO GRUPO DOS BENZIMIDAZÓIS NO PARASITO *HAEMONCHUS CONTORTUS*.



FONTE: VELAN; HODA (2020).

4.5 PRÁTICAS DE MANEJO E CONTROLE PARASITÁRIO

O controle das helmintoses gastrintestinais, apesar de complexo, pode ser bem-sucedido quando se incluem medidas que vão além do uso de anti-helmínticos (COSTA et al., 2011). Dentre as principais medidas, pode-se citar a manutenção de refúgio no pasto, criação dos animais em sistema semi-intensivo, quarentena de animais recém-adquiridos, uso de FAMACHA para o tratamento de animais, rotação de pastagem e uso de diferentes espécies de herbívoros no mesmo pasto (MOLENTO, 2009).

4.5.1 Refúgio

Refúgio refere-se aos indivíduos de uma determinada população de parasitos que escapam da exposição a qualquer medida de controle aplicada, como os estágios de vida livre na pastagem quando os hospedeiros são tratados com anti-helmínticos ou parasitos em animais não tratados. Percentualmente, esses indivíduos, diluem a pequena progênie de parasitos resistentes que sobrevivem ao tratamento (VAN WYK et al., 2006; MOLENTO et al., 2004).

Estratégias que otimizam o conceito de refúgio estão inseridas no manejo integrado de parasitos que possui como uma das frentes, o tratamento seletivo dos animais (MOLENTO et al., 2011). Essas estratégias envolvem deixar animais em pastagens contaminadas por helmintos após o tratamento com anti-helmíntico, visto que, esses helmintos no pasto não

sofreram pressão de seleção das drogas e, conseqüentemente, permitem a infecção dos animais por parasitos ainda suscetíveis aos anti-helmínticos (VAN WYK et al., 2006). Além disso, selecionar animais para o tratamento com base em critérios clínicos e laboratoriais e não tratar a grande maioria do rebanho também permite a preservação da população de parasitos que não entram em contato com a droga (VAN WYK et al., 2006; MOLENTO et al., 2004).

4.5.2 Sistema semi-intensivo

A criação de animais no pasto, predispõe estes a infecções por helmintos e torna mais complexo o controle dos parasitos devido à contaminação dos animais durante o pastejo, sendo pior quando ocorre a criação de animais jovens e adultos no mesmo espaço e quando a refúgia possui baixa prevalência no pasto (GUIMARÃES et al., 2011; NICIURA et al., 2012). Com isso, a retirada de animais do pasto em determinados períodos do ano e/ou por um período do dia (criação semi-intensiva) e a existência de apriscos elevados com pisos ripados pode reduzir a infecção dos animais com helmintos gastrintestinais. Essa estratégia apresenta melhores condições sanitárias e permite o menor contato dos animais com suas fezes e, conseqüentemente, com os parasitos, o que reduz a possibilidade de reinfecção. Contudo, é necessário se ter em conta as características ambientais da localidade pra predizer em qual período e por quanto tempo tal manejo se faz necessário (GUIMARÃES et al., 2011; BESIÉ et al., 2016).

4.5.3 Manejo de animais recém-adquiridos

Quando animais novos são introduzidos em uma fazenda, eles trazem parasitos desconhecidos da fazenda de origem. Com isso, o risco de novas infecções por helmintos gastrintestinais e de resistência anti-helmíntica na propriedade aumenta (GUIMARÃES et al., 2011). O uso limitado de quarentena na entrada de novos animais na propriedade pode agravar a situação por permitir a introdução de diferentes agentes infecciosos, como helmintos (GOUVEIA et al., 2013). De acordo com Coles e Roush (1992), a propagação de nematodas resistentes pode aumentar com a compra de animais de outras regiões. Por tanto, o uso de quarentena de animais recém-adquiridos é fundamental para a proteção do rebanho contra a introdução de diferentes helmintos resistentes. A quarentena diminui a probabilidade de o rebanho estabelecido adquirir parasitos resistentes (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008;

GUIMARÃES et al. 2011). Recomenda-se para a boa execução desse manejo, que os animais recém adquiridos sejam tratados com anti-helmínticos com alta eficácia e permaneçam um período entre 30 a 60 dias em local isolado (quarentenário) (COSTA, 2002), até a sua incorporação.

4.5.4 Tratamento com um único grupo químico

Como a rápida rotação de grupos químicos acelera o processo de resistência, o uso sustentável de medicamentos de um único grupo químico, com monitoramento constante por contagem de ovos nas fezes e o método FAMACHA é recomendado (VAN WYK; BATH, 2002; MOLENTO et al., 2004). Com esse monitoramento se torna possível a troca da classe de anti-helmíntico só quando verificada a redução de sua eficácia. Isso se justifica pelo fato de que a seleção por um anti-helmíntico pode ocorrer dentro de várias gerações no parasito, e uma mudança estratégica no anti-helmíntico pode reduzir a frequência de alelos resistentes ao princípio químico ativo (GUIMARÃES et al., 2011).

Outra estratégia com esse foco é a rotação lenta de duas classes de anti-helmínticos a serem usados entre, mas não dentro, de uma única geração. Considerando que o intervalo máximo de uma geração em tricostrôngilos comuns de ruminantes é de cerca de um ano, dentro deste intervalo apenas anti-helmínticos de amplo espectro de um grupo devem ser usados (PRICHARD et al., 1980). As vantagens desse tipo de rotação lenta são que nenhum parasito é submetido a pressão de seleção a anti-helmínticos de amplo espectro de ambos os grupos, de modo que a seleção de parasitos para resistência múltipla é menos provável. Além disso, se o uso de um grupo de anti-helmínticos é suspenso por uma geração ou mais, alguma reversão para suscetibilidade a esse grupo poderá ocorrer (PRICHARD et al., 1980).

Em suma, a substituição estratégica de grupos de drogas após monitoramento de sua eficácia pode diminuir a pressão de seleção de genes homozigotos resistentes, o que retarda, consequentemente, o processo de seleção de parasitos (GOUVEIA et al., 2013).

4.5.5 FAMACHA

O método FAMACHA foi desenvolvido na África do Sul e permite a classificação de animais em categorias com base no nível de coloração da conjuntiva e valores de hematócrito (VAN WYK; BATH, 2002; VILELA et al., 2012). É um método específico para infecções por *H. contortus*, onde apenas animais considerados anêmicos são tratados. Esse método

diminui a pressão de seleção de indivíduos resistentes, por reduzir drasticamente a frequência de tratamentos com anti-helmínticos.

Em estudos prévios, foi determinado que o método FAMACHA é uma ferramenta útil na identificação de ovinos e caprinos anêmicos no Brasil (MOLENTO et al., 2004, 2011; VILELA et al., 2012). Além disso esse método pode ser utilizado na seleção de animais resistentes e/ou resilientes para a haemoncose (BURKE; MILLER, 2008). A desvantagem desse método é não detectar outros parasitos ou causas não parasitárias que provocam anemia (MOLENTO et al., 2011). Além disso, requer um percentual de *H. contortus* no rebanho acima de 60% e necessita de técnicos treinados para a constante avaliação (VILELA et al., 2012).

4.5.6 Rotação de pastagens

O manejo da pastagem quando feito de forma estratégica com anti-helmínticos e o conceito de refugia reduzem a contaminação do pasto e as taxas de reinfecção por *Haemonchus* spp. (SOUZA et al., 2000). Como as larvas de *Haemonchus* spp. sobrevivem na pastagem por um período limitado de tempo, é possível desenvolver sistemas de rotação de pastagens destinadas a introdução de animais em um piquete somente após a redução do número de larvas infectantes no pasto, o que pode diminuir o grau de infecção (TORRES-ACOSTA et al., 2008). Contudo, para determinar a forma mais efetiva dessa estratégia para uma fazenda, é necessário a compreensão da epidemiologia de *Haemonchus* spp. e sua interação com o hospedeiro nas variáveis de clima, manejo e produção (SOUZA et al., 2000). Em países de clima temperado, o tempo de sobrevivência das larvas é maior e, portanto, o sucesso e eficácia dessa estratégia é mais difícil em rotações de curto prazo. Em contraste, em condições tropicais, as larvas possuem sobrevida no pasto relativamente curta e agregam resultados positivos no controle das infecções por *Haemonchus* spp. (TORRES-ACOSTA et al., 2008).

Nesse manejo, após o tratamento com anti-helmínticos, os animais não são devolvidos ao mesmo pasto contaminado. Em vez disso, eles são movidos a uma nova pastagem que ficou vazia por um período de tempo dependente do ambiente (ex.: clima tropical, temperatura) e estação (ex.: verão, inverno). Essa prática evita a imediata reinfecção dos animais, reduz a necessidade de tratamentos e reduz a taxa de contaminação do novo pasto. Porém, se a resistência estiver presente em populações de *Haemonchus* spp. essa estratégia irá selecionar vermes resistentes (KEARNEY et al., 2016).

4.5.7 Consórcio de animais

O consórcio de animais de diferentes espécies apresenta benefícios sustentáveis e econômicos. Para os produtores sem espaço físico ou recursos para realizar a rotação de pastagem, a introdução de outras espécies no mesmo pasto é uma estratégia que pode ser eficaz (SOUTHCOTT; BARGER, 1975). Experimentos de descontaminação da pastagem demonstraram que, ao utilizar bovinos, mesmo que sem tratamento anti-helmíntico, o volume de parasitos no pasto diminuiu (KEARNEY et al., 2016). Consorciação de mais de um hospedeiro simultaneamente ou, alternativamente, pode restringir o consumo de larvas infectantes pelo hospedeiro específico e, conseqüentemente, diminuir as taxas de infecção (NAEEM et al., 2021).

4.5.8 Falhas de Manejo e sua influência na seleção de resistência às drogas

A ausência ou má implementação dos manejos citados acima e outras falhas de gestão, favorecem o aparecimento da resistência anti-helmíntica. Dentre as falhas, pode-se citar o tratamento de todos os animais do rebanho, que tem como principal consequência a sobrevivência de parasitos resistentes capazes de contaminar o pasto com ovos e larvas resistentes. Assim, os animais serão contaminados apenas com L3 resistentes (TORRES-ACOSTA et al., 2008). Outra falha comum ocorre quando existe a administração de doses erradas de anti-helmínticos que pode partir da falta da importância de garantir doses adequadas e da subestimação dos pesos dos animais (BESIER; HOPKINS, 1988), causando também a seleção de parasitos resistentes (TORRES-ACOSTA et al., 2008). Essa situação pode ocorrer quando anti-helmínticos não foram testados em espécies que requerem tratamento. Neste caso, certas drogas, quando administradas para caprinos, necessitam de doses mais altas para atingir os níveis plasmáticos e tóxicos aos parasitos (SPRENGER et al., 2012). Isso poderia explicar os relatos de eficácia abaixo do ideal nesses animais (EDWARDS et al., 2007; JACKSON et al. 2012).

Também há muito reconhecido, como um importante fator causal para a resistência anti-helmíntica, a alta frequência de tratamentos (MOLENTO; PRICHARD, 1999; PRICHARD et al., 1980). O tratamento dos animais em intervalos curtos permite o rápido desenvolvimento de resistência anti-helmíntica devido à alta pressão de seleção do parasito. Além disso, o uso intensivo de anti-helmínticos também aumenta a presença de resíduos na

carne, leite e o custo de produção (GUIMARÃES et al., 2011). O tratamento com anti-helmíntico fornece uma vantagem aos parasitos que sobrevivem e que carregam alelos de resistência, visto que, esses parasitos passam esses alelos para seus descendentes e assim sucessivamente se a seleção for mantida (BARTRAM et al., 2012). Em ambientes ou estações favoráveis ao desenvolvimento de larvas infectantes na pastagem, tratamentos em intervalos curtos e, muitas vezes independentes da ameaça real imediata, tem sido a base dos programas de controle em muitos casos. Com isso, se torna inevitável a ocorrência de altos níveis de resistência a uma ampla gama de anti-helmínticos, o que destaca a falta de sustentabilidade dos regimes de controle baseados principalmente em tratamentos com produtos químicos (BESIER et al., 2016).

Embora os tratamentos anti-helmínticos sempre sejam necessários, abordagens racionais para minimizar sua frequência por meio dos princípios do manejo integrado são recomendadas. Esses princípios têm como base: 1) a manipulação da exposição de populações de hospedeiros suscetíveis à ingestão significativa de larvas infectantes; 2) evitar tratamentos rotineiros por meio do monitoramento dos rebanhos ou indivíduos dentro deles; e 3) incorporar abordagens de controle não químico, como nutrição e genética (BESIER et al., 2016). Além disso, deve-se levar em conta os diferentes requisitos para o tratamento das classes de rebanho em vários estágios de suscetibilidade. Animais jovens ou filhotes requerem mais suporte anti-helmíntico do que adultos até que uma imunidade a nematodas seja desenvolvida. Outras formas de manejo específico podem ser necessárias para fêmeas lactantes durante o peri-parto, visto que nesse período é mais fácil o desenvolvimento da haemoncose hiperaguda, onde a morte é o primeiro sinal clínico e sinais de anemia severa são encontrados nos animais sobreviventes. Nesse período, devido ao estresse nutricional em torno do momento do parto, a suplementação nutricional (inclusive proteica) pode aliviar e restaurar um grau de imunidade as fêmeas e, conseqüentemente, a resiliência frente as infecções por *Haemonchus* spp. (HOSTE et al., 2016). Além disso, é um método sustentável no controle das infecções em filhotes e com menos dependência dos anti-helmínticos (HOUDIJK, 2008).

4.6 DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA

Ao longo de anos, inúmeras técnicas de detecção da resistência vêm sendo descritas. A emergência da resistência parasitária, torna contínua a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias e aprimoramento destas técnicas (COLES et al., 1992b). Cada método

apresenta seus prós e contras em termos de especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e custo (VÁRADY; CORBA, 1999).

4.6.1 Técnicas fenotípicas *in vivo*

4.6.1.1 Teste controlado de eficácia

O teste controlado de eficácia compara o número de larvas de nematodas no trato gastrointestinal por meio de necropsia entre animais tratados e não tratados. A resistência é geralmente confirmada quando a redução na contagem de larvas e de parasitos adultos é menor que 90% (JABBAR et al., 2006). Esse método possui como vantagens sua alta sensibilidade, além de permitir a identificação dos parasitos a nível de espécie (MUCHIUT et al., 2018). Entretanto, o procedimento é laborioso e caro, o que reflete em seu menor uso devido à baixa praticidade com a aquisição, manipulação e sacrifício dos animais (JABBAR et al., 2006).

4.6.1.2 Teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

O TRCOF é um método amplamente utilizado e caracteriza a resistência quando a diminuição do número de ovos de nematodas contados nas fezes, após o tratamento anti-helmíntico é inferior a 95%, em relação à contagem no pré-tratamento (FORTES; MOLENTO, 2013). A técnica possui como vantagem sua fácil aplicação, não necessitando do abate de animais e permitindo a identificação dos parasitos a nível de gênero por meio de coprocultura (MUCHIUT et al., 2018). Entretanto, essa é uma técnica com baixa sensibilidade e não é capaz de detectar a resistência quando o nível de indivíduos geneticamente resistentes for menor de 25% na população (ESTEBAN-BALLESTEROS et al., 2017).

4.6.2 Técnicas fenotípicas *in vitro*

Como alternativa viável aos testes *in vivo*, os métodos *in vitro* permitem avaliar a sensibilidade dos estágios de vida livre (ovo, L1, L2 e L3) aos anti-helmínticos e, com isso, detectar a resistência (CHAGAS; MOLENTO, 2011). São ensaios mais baratos, rápidos e evitam quaisquer efeitos do hospedeiro. Além disso, esses testes podem usar uma variedade de concentrações de drogas que geram valores definidos de concentração letal de 50% (CL50)

e razões de resistência, o que permite definir o efeito de um anti-helmíntico na população de parasitos (DEMELER et al., 2013).

Os testes *in vitro*, em geral, necessitam de pessoas qualificadas para sua realização e interpretação e de isolados resistentes e sensíveis que sirvam de referência para a padronização da técnica, o que torna sua utilização ainda restrita a laboratórios de pesquisa (MUCHIUT et al., 2018). Além disso, os testes *in vitro* não são direcionados para as fases que de fato atuam no hospedeiro. Esses métodos possuem baixa sensibilidade e reprodutibilidade o que permite determinar com confiança apenas a resistência clínica, dificultando a detecção da seleção precoce da resistência (HUMBERT et al., 2001).

4.6.2.1 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

O teste de eclodibilidade de ovos (TEO) é um método *in vitro* específico para detecção da resistência aos BZ em helmintos de ruminantes. É feito por meio da avaliação da atividade ovicida dessa classe de fármaco (TAYLOR et al., 2002). Para esse teste, amostras fecais frescas com no máximo 3 h do momento da coleta ou mantidas em condições anaeróbias são necessárias para resultados confiáveis. O TEO tem como vantagem necessitar de apenas uma amostra de fezes e como desvantagem, sua baixa reprodutibilidade e sensibilidade, só detectando resistência quando ao menos 25% da população carrega esses genes (CUDEKOVÁ et al., 2010).

4.6.2.2 Teste de desenvolvimento larvar (TDL)

O teste de desenvolvimento larvar (TDL), permite caracterizar fenotipicamente a resistência aos BZ, ao levamisol (LEV), LM e aos derivados do amino-acetonitrilo (DAA) (KOTZE; PRICHARD, 2016). No TDL, ovos de nematodas ou L1 são expostos a diferentes concentrações de anti-helmínticos. Seu resultado é baseado na mensuração do efeito das drogas no desenvolvimento larvar, até L3. É um método sensível e que permite identificar resistência a nível de 10% na população. Contudo, é mais laborioso e demanda mais tempo de execução que o TEO (JABBAR et al., 2006).

4.6.3 Técnicas genotípicas/moleculares

Os métodos moleculares permitem identificar diferenças (ex. mutações) entre as sequências de DNA de parasitos susceptíveis e resistentes. Apesar de seu uso também não estar difundido no diagnóstico de rotina e permitir a detecção confiável da resistência apenas aos BZ, esses métodos possuem um futuro promissor (KOTZE; PRICHARD, 2016).

Os métodos moleculares mais comuns para detecção de mutações em genoma de populações de *H. contortus* resistentes aos BZ são: PCR convencional, nested-PCR, PCR alelo-específico, PCR – *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), PCR – Sistema de amplificação por mutação refratária (ARMS) e PCR em tempo real (qPCR) e ainda o pirosequenciamento (NICIURA et al., 2012). Tais métodos são empregados em diversas pesquisas que buscam a determinação de marcadores genotípicos ligados a resistência anti-helmíntica. Estão inseridos nesses estudos a identificação de polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* – SNP), que são modificações em bases nitrogenadas únicas em uma dada sequência de DNA. Atualmente, a determinação de SNPs ligados a resistência está mais disponível para o grupo dos BZ (BARRÈRE et al., 2013).

As vantagens dessas metodologias são, a alta sensibilidade e sua especificidade pois permitem detectar mutações a nível de 1% na população parasitária (JABBAR et al., 2006). Isso representa uma grande vantagem comparado com as técnicas clássicas (métodos fenotípicos) pois elas permitem a detecção de parasitos resistentes num estágio muito inicial (JABBAR et al., 2006). São, portanto, mais eficientes para a prevenção e controle da resistência. Além de detectar marcadores genotípicos associados à sobrevivência dos parasitos às drogas anti-helmínticas, permitem o monitoramento de genótipos resistentes, antes do aparecimento da resistência na população. Além disso, o material de DNA pode ser extraído, não apenas de adultos, mas também de L3 e ovos (SANTOS et al., 2017), o que evita o sacrifício dos animais para obtenção de parasitos adultos. Por outro lado, similarmente aos métodos *in vitro*, são técnicas onerosas e que necessitam de equipamentos sofisticados e pessoas qualificadas.

4.6.3.1 PCR convencional

A PCR é um procedimento rápido para a amplificação enzimática *in vitro* de um segmento de DNA específico (DNA alvo ou DNA molde) (AUSUBEL et al., 2003). Para a realização da PCR convencional é necessário um tampão, que mantém constante o pH da reação; dNTP (mistura equimolar dos desoxirribonucleosídeos trifosfato dATP, dTTP, dCTP e dGTP) que fornece as bases para a síntese do DNA; Mg^{2+} (cátion divalente), cofator

enzimático; um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos que delimita o DNA alvo da amplificação e constitui o sítio de iniciação para a Taq DNA polimerase; Taq DNA polimerase, enzima que catalisa a síntese de DNA a partir de um DNA molde; e DNA (ISHII et al., 2017).

A reação de PCR ocorre em ciclos de amplificação, realizados em um termociclador. Esses ciclos são compostos pelas etapas de desnaturação, abertura da fita dupla de DNA, anelamento de iniciadores, ligação dos iniciadores à fita de DNA molde, extensão e síntese enzimática do DNA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O DNA amplificado é avaliado por meio da eletroforese em gel de agarose, que tem como finalidade a separação dos fragmentos de DNA (FÁVERO et al., 2020).

4.6.3.2 Nested-PCR

A nested-PCR é uma técnica na qual se realiza duas reações de PCR consecutivas. Na primeira reação, são utilizados iniciadores mais externos, que flanqueiam o DNA alvo e geram um produto de amplificação maior. Na segunda reação, o produto da primeira reação é utilizado como DNA molde para iniciadores mais internos e que geram um produto menor (NICIURA et al., 2012; BRASIL et al., 2012). Assim como a PCR convencional, a reação de nested-PCR envolve a utilização dos mesmos componentes e condições de amplificação (BRASIL et al., 2012).

4.6.3.3 PCR alelo-específico

A PCR alelo-específico é um método de detecção de mutações em pontos definidos do genoma. É baseado no uso de dois iniciadores não específicos que diferem apenas nas últimas bases na extremidade 3' e dois iniciadores alelo-específicos (um primer reverse e um primer forward) (CHAGAS et al., 2016). Nesse processo, dois produtos são amplificados – um fragmento alelo-específico e um fragmento alelo-inespecífico. Para a genotipagem de um indivíduo, este método requer uma reação de PCR com esses quatro iniciadores (HUMBERT; ELARD, 1997).

4.6.3.4 PCR-RFLP

A PCR-RFLP consiste na amplificação de uma sequência de DNA por PCR, seguida pela digestão do produto amplificado com uma enzima de restrição (endonuclease de

restrição), que reconhece e cliva uma sequência específica de bases em uma molécula de DNA. Como os polimorfismos eliminam ou criam sítios de restrição para a enzima, eles podem ser identificados após a eletroforese, por meio das diferenças de tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão (ASUBEL et al., 2003).

4.6.3.5 ARMS-PCR

A ARMS-PCR é uma ferramenta de genotipagem SNP que permite diferenciar e amplificar um alelo do outro. O princípio da ARMS-PCR consiste na utilização, na mesma reação de PCR, de quatro iniciadores; dois iniciadores externos (forward e reverse) controles e dois iniciadores internos específicos: um oligonucleotídeo iniciador forward, que se liga a um alelo, e um oligonucleotídeo iniciador reverse, que se liga ao outro alelo (NICIURA et al., 2012).

4.6.3.6 qPCR

A maior desvantagem das técnicas moleculares descritas acima é a necessidade de eletroforese em gel de agarose para comprovação e avaliação dos alelos. Como resultado, o trabalho se torna demorado para realização dessas reações em indivíduos suficientes para obter um número de frequências significativas de alelos (WALSH et al., 2007). A qPCR não requer a detecção da banda de DNA em gel de agarose e detecta o produto amplificado durante a reação (monitoramento em tempo real), o que minimiza a possibilidade de contaminação da amostra. Na reação de qPCR, os produtos amplificados produzidos são marcados com moléculas fluorescentes ou corantes que se ligam ao DNA o que permite a determinação de quantidades exatas (relativas ou absolutas) de DNA amplificado em cada amostra. A fluorescência é monitorada durante todo o processo de PCR, ao longo de 30 a 45 ciclos e quanto maior o número inicial de moléculas de DNA na amostra, mais rápido a fluorescência aumenta durante os ciclos. O ciclo no qual a fluorescência pode ser detectada é denominado de ciclo de quantificação (Cq) e refere-se ao ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR. A fluorescência emitida abaixo desse valor é considerada ruído de fundo (background) (CEPIN, 2017).

Essa técnica fornece dados quantitativos do produto amplificado e permite a rápida identificação e quantificação de alelos resistentes e suscetíveis em amostras de nematodas da

mesma espécie (WALSH et al., 2007). Além disso, possui como outras vantagens, a alta sensibilidade e reprodutibilidade e a capacidade de processamento de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo (útil em inquéritos de larga escala). As desvantagens desse método são; o alto custo dos equipamentos e reagentes, a necessidade de pessoas bem treinadas para a execução, pois a aplicação das amostras nas placas é um processo muito mais preciso quando comparada a PCR convencional, devido ao maior número de reagentes e amostras) e não permitir a diferenciação de populações homozigotos resistentes (RR) de heterozigotos resistentes (SR) (CEPIN, 2017).

4.6.3.7 Nemabiome: uma nova biologia molecular na Parasitologia

Para facilitar o uso da biologia molecular Avramenko et al. (2015) desenvolveram e validaram o Nemabiome, uma nova abordagem de sequenciamento ou metabarcoding, que quantifica com precisão as proporções relativas de larvas de nematodas parasitos isolados de fezes de bovinos, equinos e ovinos (AVRAMENKO et al., 2015). A técnica baseia-se no sequenciamento de nova geração do locus de rDNA do gene espaçador interno transcrito 2 (ITS-2), que é um pedaço de RNA não funcional, para identificação interespecífica. Esse locus fornece um nível apropriado de sequências variáveis de interespecíes e intra-espécies para a maioria de parasitos gastrintestinais de bovinos, dos quais a maioria pertence a superfamília Trichostrongylidae. O método Nemabiome oferece várias vantagens em relação às abordagens anteriores, como PCR convencional, qPCR e PCR multiplex na identificação de espécies de parasitos presentes em amostras fecais de bovinos e outros animais. As principais vantagens do Nemabiome são: 1) não requer suposições sobre quais espécies de parasitos podem estar presentes em uma amostra e 2) no Nemabiome um único par de iniciadores de PCR (NC1 e NC2) é necessário para amplificação do gene ITS-2 (AVRAMENKO et al., 2015). Consequentemente, espécies novas ou inesperadas podem ser detectadas, e o mesmo ensaio pode ser aplicado em diferentes condições climáticas e geográficas sem mudanças na metodologia; 3) a abordagem pode distinguir até mesmo strongilídeos de espécies intimamente relacionadas, visto que as principais espécies de helmintos gastrintestinais possuem polimorfismos de nucleotídeo único específicos nesse locus; 4) é altamente sensível e pode detectar espécies presentes em até 0,1% da população em uma amostra. Em resumo, o Nemabiome fornece uma imagem detalhada da composição de espécies da comunidade de parasitos gastrintestinais em grandes conjuntos de amostras e possui um grande número de aplicações potenciais em diagnósticos, vigilância e pesquisa

(AVRAMENKO et al., 2017). Avramenko et al. (2019) validaram o Nemabiome para detecção e quantificação da frequência dos SNPs F200Y, F167Y e E198A em sete espécies diferentes de parasitos provenientes de 164 rebanhos de ovinos. Em uma única execução de sequenciamento MiSeq eles demonstraram que essa abordagem fornece uma medida precisa de frequência de alelos resistentes e possui nível de detecção na frequência de até 0,1%. Esse resultado torna o Nemabiome uma ferramenta valiosa para o rastreamento de mutações nos estágios iniciais de resistência (AVRAMENKO et al., 2019).

4.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR E PRÁTICAS DE MANEJO ASSOCIADAS A RESISTÊNCIA PARASITÁRIA NO BRASIL

No Brasil, estudos com foco no diagnóstico molecular da resistência de nematodas de ruminantes já foram feitos. Niciura et al. (2012) realizaram um levantamento molecular de frequências alélicas da F200Y e correlacionaram com práticas de manejo dos rebanhos e a resistência parasitária em 33 fazendas de ovinos no Estado de SP. A genotipagem do polimorfismo F200Y foi feita por meio de nested-PCR e ARMS-PCR. Nesse estudo, foram encontradas frequências de genótipos resistentes (RR) de 0 a 66.7% e alelos de resistência de 9 a 74%. A alta frequência de genótipos resistentes foi associada a, em ordem decrescente: 1) propriedades com poucos anos de atividade; 2) propriedade com animais da raça Dorper e Suffolk e mestiços; 3) uso de rotação de pastagens; 4) manter ovinos no mesmo pasto que bovinos e/ou equinos; 5) tratamento de todos os animais com anti-helmíntico; 6) rotação de anti-helmínticos a cada tratamento e 7) cálculo de dose por estimativa visual de peso dos animais. No mesmo ano, Brasil et al. (2012), avaliaram a frequência da resistência aos BZ em rebanhos de bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos, de MG, SP e SC. A amplificação do gene da beta-tubulina foi feita por meio de nested-PCR e para detecção de F200Y, F167Y e E198A, foi realizado sequenciamento. Todos os isolados de *H. contortus* apresentaram algum SNP, contudo, a frequência foi maior nos isolados do rebanho ovino de SP e caprino de SC. F167Y foi detectado nos isolados de *H. contortus* dos rebanhos ovinos de SP e MG e caprinos de SC. O SNP F200Y foi o polimorfismo de maior frequência em *H. contortus* isolados do rebanho ovino de SP e MG, do caprino de SC e MG e bubalino de MG. O SNP E198A não foi detectado.

Nunes et al. (2013) avaliaram a frequência da resistência aos BZ em populações de *H. contortus* de rebanhos bubalinos, caprinos e ovinos dos Estados de MG e SP. A frequência da resistência foi feita pela genotipagem do polimorfismo F200Y por meio da técnica de PCR

alelo-específico. Nesse estudo, a frequência de alelos resistentes de F200Y foi menor no rebanho caprino (9%) e bubalino (7%) do que no ovino (43%).

Santos et al. (2014) apresentaram o primeiro estudo no Brasil com utilização de qPCR para detecção de três polimorfismos associados a resistência aos BZ (F200Y, F167Y e E198A). O estudo foi conduzido em 6 fazendas de ovinos do Estado do CE e foram encontradas frequências de alelos resistentes de até 36.4 e 92.7% para F200Y e F167Y, respectivamente. O SNP E198A resultou apenas na detecção de alelos sensíveis.

Chagas et al. (2016) determinaram as frequências de F200Y em *H. contortus* isolados de 12 fazendas de ovinos no PA. Além disso, caracterizaram as práticas de manejo que poderiam favorecer o surgimento de resistência anti-helmíntica nessas áreas. Os alelos resistentes e sensíveis foram identificados por meio de PCR alelo-específico e a presença de F200Y foi observada em 91.6% das propriedades. Nesse estudo, as práticas de manejo não foram correlacionadas com os dados da PCR e foram utilizadas apenas para caracterização dessas práticas nas propriedades. A raça mais frequente foi Santa Inês. Todas as propriedades possuíam sistema semi-intensivo de criação, que envolvia liberar os animais no pasto das 9 da manhã as 3 da tarde, seguido de confinamento até o outro dia. Destes, 41.6% dos criadores realizavam rotação de pastagem e 91.6% integravam bovinos no mesmo pasto. A frequência de tratamentos variou de uma a nove vezes por ano e o tratamento foi realizado em todos os animais do rebanho sem uso de pesagem. Nenhum dos produtores utilizou FAMACHA e nenhum teste foi feito para avaliar a eficácia do anti-helmíntico.

Santos et al. (2017b) realizaram um estudo com ovinos artificialmente infectados com L3 do isolado de *H. contortus*-ISE (*inbred-susceptible Edinburgh*) para determinação das frequências alélicas de F200Y, F167Y e E198A por meio de qPCR, após seleção com oxfendazole (grupo I), IVM (grupo II) e a combinação dessas duas drogas (grupo III). Tanto os isolados dos grupos I e II apresentaram alta seleção para o SNP F167Y, enquanto os parasitos do grupo III apresentaram maior frequência do SNP F200Y, provavelmente devido ao oxfendazole. Apenas alelos sensíveis foram observados no SNP E198A. No mesmo ano, Santos et al. (2017) também realizaram a caracterização de resistência aos BZ em *H. contortus* de ovinos provenientes de 20 fazendas do Estado do CE. Os produtores passaram por questionário sobre práticas de manejo e por meio deste, foi determinado que aproximadamente 74% dos rebanhos eram criados de forma semi-intensiva. A rotação de pastagem não era feita e o cálculo de dose era feito por estimativa visual de peso dos animais. Percentual alto (41.2%) de criadores relataram a imediata integração no rebanho dos animais recém-adquiridos e aproximadamente 58% tratavam todos os animais de 3 a 4 vezes por ano.

Nesse estudo, pela primeira vez no Brasil, alelos resistentes da mutação E198A foram detectados em cinco isolados em baixíssimas frequências. Os SNPs F200Y e F167Y apresentaram frequências de até 64.5 e 78.4%, respectivamente. A associação dos dados da qPCR com os dados do manejo não foi feita.

Lambert et al. (2017), avaliaram as características de manejo e determinaram as frequências de F167Y e F200Y em populações de *H. contortus* isolados de 29 rebanhos caprinos em várias regiões da BA. Os rebanhos eram compostos de 15 a 140 caprinos criados de forma semi-intensiva, onde os animais eram mantidos em áreas comuns durante o dia e alojadas em apriscos durante a noite. O tratamento com anti-helmíntico era feito em todos os animais semestralmente (41%) e quinzenalmente (17%) com cálculo de dose por estimativa visual de peso. As frequências de alelos de cada um dos SNPs foram obtidas por meio de qPCR e genotipagem. As frequências genotípicas para o SNP F200Y foram em média de 40% para homozigoto sensível (SS), 41.1% para SR e 18.9% para RR. As frequências alélicas do SNP F200Y tiveram uma média de 57.8% para o alelo sensível e 42.2% para o alelo resistente. Para o SNP F167Y, as frequências genotípicas médias foram de 34.2% para SS, 33% para SR e 32.7% para RR. As frequências de alelos sensíveis e resistentes do SNP F167Y foram em média de 50% para ambos os alelos. Nenhuma associação entre frequências genotípicas e alélicas e características de manejo no rebanho foram observadas.

Fávero et al. (2020), investigaram a frequência dos SNPs F167Y, F200Y e E198A em *H. contortus* e *H. placei* isolados de 61 propriedades de bovinos de Rondônia, Pará, Tocantins, Maranhão, Alagoas, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, MS, MG, SP, PR e RS. Para quantificação das frequências de alelos de cada um dos SNPs foi feita PCR convencional e pirosequenciamento. Apenas 11.4% das populações foram classificadas como resistentes com o diagnóstico molecular. Em duas populações de *H. placei* com *H. contortus*, uma teve frequência do SNP F200Y de 17% (isolado do RS) e a outra teve frequência de 19% do SNP E198A (isolado do PA). Em três populações contendo exclusivamente *H. placei*, o SNP E198A teve frequência entre 15 e 21% e outras duas populações tiveram frequência de 26 e 30% do SNP F167Y e F200Y, respectivamente. Os autores determinaram que no PR, seis propriedades de bovinos foram avaliadas e apresentaram nas coproculturas um total de 341 de L3 das quais 90.9% eram *H. placei*, 4.1% de *H. placei* e *H. contortus*, 2% eram de *H. contortus* e *H. similis* e 3% era apenas de *H. similis*. Contudo, as frequências alélicas dos SNPs foram baixas nesse Estado e, portanto, não determinadas.

4.8 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA EM PEQUENOS RUMINANTES NO PARANÁ

No PR, estudo conduzido por Thomaz-Soccol et al. (1996), avaliou a eficácia de anti-helmínticos em seis rebanhos ovinos. As propriedades possuíam 100 ou mais animais e para a avaliação foi realizado o TRCOF. Quatro grupos de anti-helmínticos foram testados (BZ, imadazotiazoles, LM e salicilanilidas) e em todas as propriedades foi determinada resistência. Em 50% das propriedades foi determinada resistência as quatro classes de anti-helmínticos, em 33.3% a três classes e em 16.6% a duas classes. Cunha Filho et al. (1998) detetaram a resistência anti-helmíntica e caracterizaram práticas de manejo parasitário em 10 propriedades de ovinos na região de Londrina, por meio de TRCOF e questionários. Nesse estudo, 80% das propriedades não realizam rotação de pastagens e a frequência média de tratamentos era de 8 vezes/ano. Todas as propriedades apresentaram resistência aos anti-helmínticos utilizados (ABZ, IVM e MOX). Thomaz-Soccol et al. (2004) avaliou a eficácia de anti-helmínticos em 42 fazendas de ovinos em cinco regiões do Paraná. Os rebanhos possuíam entre 50 a 250 animais, eram criados em sistema semi-intensivo, tratados com anti-helmínticos de 6 a 12 vezes/ano e em algumas propriedades havia rotação de drogas. O TRCOF foi usado contra BZ, Imadazotiazoles, LM e Salicilanilidas. Os BZ apresentaram resistência em 8 dos 11 grupos testados. Por fim, Vila Nova et al. (2014), avaliaram a eficácia do nitroxinil (NTX) e IVM, por meio de TRCOF, em um rebanho de 29 ovinos em São João do Ivaí, PR. Neste estudo a IVM e o NTX apresentaram, respectivamente, 46 e 66% de eficácia.

4.9 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CAPÍTULO I

Reconhecer o risco da haemoncose e a importância de medidas de prevenção efetivas é essencial para evitar o óbito de ovinos e caprinos em áreas endêmicas. No entanto, mesmo com condições favoráveis para a infecção por *H. contortus*, várias opções de tratamento, práticas de manejo e diagnósticos auxiliam no seu controle. Contudo, embora uma ampla gama de anti-helmínticos esteja disponível para o tratamento, *H. contortus* possui um histórico de capacidade em desenvolver resistência a essas drogas e, consequentemente, limitando sua eficácia. Logo, na tentativa de diminuir a pressão de seleção de parasitos resistentes, algumas práticas de manejo são essenciais. Como exemplo, o sinal clínico de anemia provocado por *H. contortus* é facilmente diagnosticável pelo método FAMACHA. Além disso, medidas que otimizem a frequência de tratamentos, o conceito de refugia e o manejo do pasto, também são componentes importantes em programas de controle da

haemoncose. Com relação ao diagnóstico, o uso de testes para detecção da resistência mais práticos e econômicos ajudam significativamente no controle de *H. contortus*, por permitirem identificar drogas que permanecem viáveis nas propriedades.

5 REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p. 91-106, 2004.
- ALVAREZ, L. I.; IMPERIALE, F. A.; SÁNCHEZ, S. F.; MURNO, G. A.; LANUSSE, C. E. Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 75-89, 2000.
- ASHRAF, S.; PRICHARD, R. K. *Haemonchus contortus* microtubules are cold resistant. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 20–22, 2014.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 2003.
- AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; LEWIS, R.; YAZWINSKI, T. A.; WASMUTH, J. D.; GILLEARD, J. S. Exploring the gastrointestinal "Nemabiome": Deep Amplicon Sequencing to Quantify the Species Composition of Parasitic Nematode Communities. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. 1-18, 2015.
- AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; LEWIS, R.; BICHUETTE, M. A.; PALMEIRA, B. M.; YAZWINSKI, T. A.; GILLEARD, J. S. The use of nemabiome metabarcoding to explore gastro-intestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. **International Journal for Parasitology**, v. 47, p. 893-902, 2017.
- AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; MELVILLE, L.; BARTLEY, Y. WIT, J.; QUEIROZ, C.; BARTLEY, D.; GILLEARD, J. S. Deep amplicon sequencing as a powerful new tool to screen for sequence polymorphisms associated with anthelmintic resistance in parasitic nematode populations. **International Journal for Parasitology**, v. 49, p. 13-26, 2019.
- BALTRUŠIS, P.; HALVARSSON, P.; HÖGLUND, J. Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 411–419, 2018.
- BARRÈRE, V.; ALVAREZ, L.; SUAREZ, G.; et al. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 344–349, 2012.

BARRÈRE, V.; KELLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; PRICHARD, R. K. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, p. 464–470, 2013.

BARTRAM, D. J. LEATHWICK, D. M.; TAYLOR, M. A.; GEURDEN, T.; MAEDER, S. J. The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 3-4, 2012.

BENAVIDES, M. V.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. Genomic Regions Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 470–480, 2016.

BERGER, J. The resistance of a field strain of *Haemonchus contortus* to five benzimidazole anthelmintics in current use. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 46, p. 369-372, 1975.

BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 95-143.

BESIER, R. B.; HOPKINS, D. L. Anthelmintic dose selection by farmers. **Australian Veterinary Journal**, V. 65, N. 6, P. 193-194, 1988.

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1–2, p. 101–107, 2008.

BRASIL, B. S. A. F.; NUNES, R. L.; BASTIANETTO, E.; et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 469–479, 2012.

BROWN, H.D.; MATZUK, A.R.; ILVES, I.R.; PETERSON, L.H.; HARRIS, S.A.; SARETT, L.H.; EGERTON, J.R.; YAKSTIS, J.J.; CAMPBELL, W.C.; CUCKLER, A.C., Antiparasitic drugs-IV. 2-(40-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, p. 1764-1765, 1961.

BURKE, J. M.; MILLER, J. E. Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/resilience in offspring of stud rams. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 85-92, 2008.

CARMICHAEL, I., VISSER, R., SCHNEIDER, D., SOLL, M. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.58, p. 93, 1987.

CEPIN, U. **Real-time PCR (qPCR) technology basics**. 2017. Disponível em: <<https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>>.

CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Protocolos fenotípicos para nematoides gastrintestinais. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 23-54.

CHAGAS, A. M.; SAMPAIO JUNIOR, F. D.; PACHECO, A.; CUNHA, A. B.; CRUZ, J. S.; SCOFIELD, A. GOÊS-CAVALCANTE, G. F200Y polymorphism of the β -tubulin isotype 1 gene in *Haemonchus contortus* and sheep flock management practices related to anthelmintic resistance in eastern Amazon. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 104-108, 2016.

CHAUDHRY, U.; REDMAN, E.M.; RAMAN, M.; GILLEARD, J.S.; Genetic evidence for the spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 721–728, 2015.

COSTA, A. L. Manejo sanitário e principais doenças de caprinos e ovinos. In: **SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA; SEMANA DA CAPRINO-OVINOCULTURA BRASILEIRA; FEIRA DE PRODUTOS E DE SERVIÇOS AGROPECUÁRIOS**. Fortaleza: Federação da Agricultura do Estado do Ceará, 2002. p. 219-248.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.65-71, 2011.

COLES, G.C.; ROUSH, R.T. Slowing the spread of anthelmintic-resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. **Veterinary Research**. v. 130, p. 505- 510, 1992.

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

(WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992b.

CRAIG, T.M. Gastrointestinal Nematodes, Diagnosis and Control. **Veterinary Clinics North America - Food Animal Practice**, v. 34, p. 185–99, 2018.

CUDEKOVÁ, P.; VÁRADY, M.; DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A. Phenotypic and genotypic characterization of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 155–159, 2010.

CUNHA-FILHO, L. F. C.; PEREIRA, A. B. L.; YAHAMAMURA, M. H. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Semina**, v. 19, p. 31-37, 1998.

DALAL, S., PRASAD, A., NASIR, A., SAINI, V.K. Cross antigenicity of immunodominant polypeptides of somatic antigen of *Oesophagostomum columbianum* with other helminths by western blotting. **Vet World.**, v. 8, p. 1279–85, 2015.

DEMELER, J.; KRÜCKEN, J.; ALGUSBI, S.; et al. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 188, n. 1, p. 10–19, 2013.

DRUDGE, J.H.; SZANTO, J.; WYATT, Z.N.; ELAM G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

EDWARDS, G. T.; SIAN, E.; MITCHELL, E.; HARDWOOD, D. G. Anthelmintic use in goats. **Veterinary Record**, v. 161, n. 22, p. 763-764, 2007.

ELMAHALAWY, S. T.; HALVARSSON, P.; SKARIN, M.; HÖGLUND, J. Genetic variants in dyf-7 validated by droplet digital PCR are not drivers for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 278–286, 2018.

ESTEBAN-BALLESTEROS, M.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; SKUCE, P. J.; et al. Quantification of resistant alleles in the β -tubulin gene of field strains of gastrointestinal nematodes and their relation with the faecal egg count reduction test. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2017.

FÁVERO, F. C.; SANTOS, L. B.; ARAÚJO, F.; RAMUNKE, S.; KRUCKEN, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BORGES, F. A. *Haemonchus* sp. in beef cattle in Brazil:

species composition and frequency of benzimidazole resistance alleles. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 185, p. 105-162, 2020.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants: Advances and limitations for diagnosis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.

GILLEARD, J. A.; REDMAN, E. Genetic Diversity and Population Structure of *Haemonchus contortus*. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. **Haemonchus contortus and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 31-68.

GODOY, P.; CHE, H.; BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 52, p. 1-11, 2016.

GOUVEIA, A. M. G.; MOLENTO, M. B.; SILVA, M. X.; BRANDÃO, H. M. GOUVEIA, G. C.; MORLÁN, J. B.; GUIMARÃES, A. S. Management practices to control gastrointestinal parasites in sheep farms in Minas Gerais, southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 464-468, 2013.

GREEN, P. E.; FORSYTH, B. A.; ROWAN, K. J.; PAYNE, G. The Isolation of a Field Strain of *Haemonchus Contortus* in Queensland Showing Multiple Anthelmintic Resistance. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 2, p. 79–84, 1981.

GUIMARÃES, A. S.; GOUVEIA, A. M. G.; CARMO, F. B.; GOUVEIA, G. C.; SILVA, M. X.; VIEIRA, L. S.; MOLENTO, M. B. Management practices to control gastrointestinal parasites in dairy and beef goats in Minas Gerais; Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 265-269, 2011.

GUNAWAN, M., SANGSTER, N.C., KELLY, J.D., GRIFFIN, D., WHITLOCK, H.V. The efficacy of fenbendazole and albendazole against immature and adult stages of benzimidazole resistant sheep trichostrongylids. **Research in Veterinary Science**. v. 27, p. 111-115, 1979.

HENNESSY, D. R. Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. **Parasitology Today**, v. 9, n. 9, p. 329-333, 1993.

HO, N. F.; GEARY, T. G.; BARSUHN, C. L.; SIMS, S. M.; THOMPSON, D. P. Mechanistic studies in the transticular delivery of antiparasitic drugs. II: Ex vivo/in vitro correlation of solute transport by *Ascaris suum*, v. 52, n. 1, p. 1-13, 1992.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; QUIJADA, J.; CHAN-PEREZ, I.; DAKHEEL, M. M.; KOMMURU, D. S.; MUELLER-HARVEY, I.; TERRIL, T. H. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V.

***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends.** Elsevier, 2016. p. 239-351.

HOUDIJK, J. G. M. Influence of periparturient nutritional demand on resistance to parasites in livestock. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 2, p. 113-121, 2008.

HUMBERT, J. F.; CABARET, J.; ELARD, L.; LEIGNEL, V.; SILVESTRE, A. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 405-414, 2001.

HUMBERT, J-F.; ELARD, L. A simple PCR method for rapidly detecting defined point mutations. **Technical Tips**, v. 2, p. 48-49, 1997.

IBGE. **Censo Agropecuário 2019.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>.

IBGE. **Censo Agropecuário 2017.** Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=41&tema=1>.

IDR-PARANÁ. **Ovinos e Caprinos.** Disponível em: <<http://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Ovinos-e-Caprinos>>.

ISHII, J. B.; ARENAL, A.; FELIX, A.; YOSHITANI, U.; BEECH, R.; MOLENTO, M. B. Diagnosis of resistance alleles in codon 167 of the beta-tubulin (Cya-tbb-1) gene from third-stage larvae of horse cyathostomins. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 92-95, 2017.

JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M. N.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, p. 2414-2431, 2006.

JACKSON, F.; VARADY, M.; BARTLEY, D. J. Managing anthelmintic resistance in goats - Can we learn lessons from sheep?. **Small Ruminant Research**, v. 103, n. 1, p. 3-9, 2012.

KEARNEY, P. E.; MURRAY, P. J.; HOY, J. M.; HOHENHAUS, M.; KOTZE, A. The 'Toolbox' of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What's in and what's out. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 93-107, 2016.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 397-428.

KŘÍŽOVÁ-FORSTOVÁ V, LAMKA J, CVILINK V, HANUŠOVÁ V, SKÁLOVÁ L. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: the consequences and potential risks. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 333-41, 2011.

KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; VAN DIJK, M.; ROOS, M. H. β -tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, n. 4, p. 500–510, 1995.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 885–936, 1988.

LAING, R.; KIKUCHI, T.; MARTINELLI, A.; et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, v. 14, n. 8, p. R88, 2013.

LAMBERT, S. M.; NISHI, S. M. MENDONÇA, L. R.; SOUZA, B. M. P. S.; JULIÃO, F. S.; GUSMÃO, P. S.; ALMEIDA, M. A. O. Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of *Haemonchus contortus* of goats. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 28-34, 2017.

LANUSSE, C. E.; PRICHARD, R. K. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. **Drug metabolism reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-279, 1993.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ, A. L. Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 465-518.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, E. P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 107–119, 1994.

LUO, X.; SHI, X.; YUAN, C.; et al. Genome-wide SNP analysis using 2b-RAD sequencing identifies the candidate genes putatively associated with resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

MATÉ, L.; BALLENT, M.; CANTÓN, C.; et al. Assessment of P-glycoprotein gene expression in adult stage of *Haemonchus contortus* *in vivo* exposed to ivermectin. **Veterinary Parasitology**, v. 264, p. 1–7, 2018.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–4, 2014.

MOHANDAS, N.; YOUNG, N. D.; JABBAR, A.; KORHONEN, P. K.; KOEHLER, A. V.; HALL, R. S.; HU, M.; HOFMANN, A.; GASSER, R. B. The complement of family M1 aminopeptidases of *Haemonchus contortus* - Biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 2, p. 65–76, 2016.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229–234, 2009.

MOLENTO, M. B.; VAN WYK, J. A.; COLES, G. C. Sustainable worm management. **The Veterinary Record**, v. 155, n. 3, p. 95–96, 2004.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GELDHOF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126–132, 2011.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 75–86, 1999.

MOTTIER, M. D. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 2, p. 129–140, 2008.

MOTTIER, M. L.; ALVAREZ, L. I.; PIS, M. A.; LANUSSE, C. E. Transtegumental of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol-water partition coefficients. **Experimental parasitology**, v. 103, p. 1-7, 2003.

MUCHIUT, S. M.; FERNÁNDEZ, A. S.; STEFFAN, P. E.; RIVA, E.; FIEL, C. A. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 43–48, 2018.

NAEEM, M.; IQBAL, Z.; ROOHI, N. Ovine haemonchosis: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-11, 2021.

NGUYEN, L.T., KURZ, T., PRESTON, S., BRUECKMANN, H., LUNGERICH, B., HERATH, H. M. P. D. I., ET AL. Phenotypic screening of the “Kurz-box” of chemicals identifies two compounds (BLK127 and HBK4) with anthelmintic activity in vitro against parasitic larval stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites and Vectors**, v. 12:, p. 1–9, 2019.

NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; GROMBONI, J. G. G.; et al. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 608–612, 2012.

NUNES, R. L.; SANTOS, L. L. BASTIANETTO, E. OLIVEIRA, D. A. A.; BRASIL, B. S. A. F. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 548-553, 2013.

PALEVICH, N.; MACLEAN, P. H.; BATEN, A.; et al. The Genome Sequence of the Anthelmintic-Susceptible New Zealand *Haemonchus contortus*. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1965–1970, 2019.

PAPADOPOULOS, E., GALLIDIS, E., PTOCHOS, S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 85–8, 2012.

PARANÁ, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Boletim agropecuário aborda a ovinocultura paranaense**. 2021. Disponível em:
<<http://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Boletim-agropecuário-aborda-ovino-cultura-paranaense>>.

PRESTON, S.; JABBAR, A.; GASSER, R. B. A perspective on genomic-guided anthelmintic discovery and repurposing using *Haemonchus contortus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 368–373, 2016.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445–453, 2001.

PRICHARD, R. K.; HALL, C. A.; KELLY, J. D.; MARTIN, I. C.; DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239–251, 1980.

REDMAN, E.; WHITELAW, F.; TAIT, A.; BURGESS, C.; BARTLEY, Y.; SKUCE, P.J.; JACKSON, F.; GILLEARD, J.S. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterized by multiple independent hard and soft selective sweeps. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1–24, 2015.

SALLÉ, G.; LAING, R.; COTTON, J. A.; MAITLAND, K.; MARTINELLI, K.; HOLROYD, N.; TRACEY, A.; BERRIMAN, M.; SMITH, W. D.; NEWLANDS, G. F. J.; HANKS, E.; DEVANEY, E.; BRITTON, C. Transcriptomic profiling of nematode parasites surviving vaccine exposure. **International Journal for Parasitology**, v. 48, p. 395–402, 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; CAMURCA-VASCONCELOS, A.L.; VIEIRA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.199, p. 160–164, 2014.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; ARAÚJO-FILHO, J.V.; ANDRE, W.P.P.; ARAÚJO, P.R.M.; VASCONCELOS, J.F.; FREITAS, E.P.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State. **Brazil Small Ruminant Research**, v. 146, p. 48–52, 2017.

SANTOS, J. M. L.; VASCONCELOS, J. F.; FROTA, G. A.; RIBEIRO, W. L. C.; ANDRÉ, W. P. P.; VIERIA, L. S.; TEIXEIRA, M.; BEVILAQUA, M. L.; MONTEIRO, J. P. *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 90–95, 2017b.

SCHEUERLE, M. C.; MAHLING, M.; PFISTER, K. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and Southern Germany. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 121, n. 3, p. 46–49, 2009.

SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; CAMPBELL, B. E.; et al. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome Biology**, v. 14, n. 8, 2013.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 b-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular Biochemistry and Parasitology**, v.120, p. 297-300, 2002.

SOUTHCOTT, W. H.; BARGER, I. A. Control of nematode parasites by grazing management - II: Decontamination of sheep and cattle pastures by varying periods of grazing with the alternate host. **International Journal for Parasitology**, v. 5, p. 45-48, 1975.

SOUZA, P; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; RAMOS , C. I. Período para desinfestação das pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos em condições naturais nos campos de Lages, SC. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 159-164, 2000.

SPRENGER, L. K.; AMARAL, C. H.; FILHO, R. V. L.; AGUIAR, T. N. MOLENTO, M. B. Eficácia do fosfato de levamisol em nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, p. 28-39, 2013.

TAYLOR, M. A; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary parasitology**, v. 103, p. 183-94, 2002.

TERRILL, T. H.; KAPLAN, R. M.; LARSEN, M.; et al. Anthelmintic resistance on goat farms in Georgia: Efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in two selected goat herds. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 261–268, 2001.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSÔA SILVA, M. C.; MILEZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSÔA SILVA; M. C. Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 159-173, 2008.

TURNBULL, F.; JONSSON, N. N.; KENYON, F.; SKUCE, P. J.; BISSET, S. A. P-glycoprotein-9 and macrocyclic lactone resistance status in selected strains of the ovine gastrointestinal nematode, *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 70–80, 2018.

VAN WYK, J.A., GERBER, H.M. A field strain of *Haemonchus contortus* showing slight resistance to rafoxanide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 137 - 142, 1980.

VAN WYK, J.A., GERBER, H.M., ALVES, R.M. Slight resistance to the residual effect of closantel in a field strain of *Haemonchus contortus* which showed an increased resistance after one selection in the laboratory. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 257 - 261, 1982.

VAN WYK, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIER, R. B. Target selective treatment for worm management - How do we sell rational programs to farmers?. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 336-346, 2006.

VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animal for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p. 509-529, 2002.

VÁRADY, M., CORBA, J. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 239–249, 1999.

VELAN, A., HODA, M. In-silico comparison of inhibition of wild and drug-resistant *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype-1 by glycyrrhetic acid, thymol and albendazole interactions. **Journal of Parasitic Diseases**, 2020.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 209–216, 2012.

VERSCHAVE, S.H., ROSE, H., MORGAN, E.R., CLAEREBOU, E., VERCRUYSSSE, J., CHARLIER, J. Modelling *Cooperia oncophora*: Quantification of key parameters in the parasitic phase. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 111–4, 2016.

VICKERS, M.; YENNING, M.; MCKENNA, P. B.; MARIADASS, B. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in new zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 3, p. 101–105, 2001.

VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Nematoides gastrintestinais e pulmonares de caprinos. In: CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 65-94.

VILA NOVA, L. E.; COSTA, M. E.; MELO, P. G. C. F.; CUNHA FILHO, L. F. C.; BARCA JUNIOR, F. A.; SILVA, L. C.; OKANO, W.; BOGADO, A. L. G. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, p. 159-171, 2014.

VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; LINHARES, E. F.; ATHAYDE, A. C. R.; MOLENTO, M. B.; AZEVEDO, S. S. FAMACHA method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 281-284, 2012.

VIRKEL, G. LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; PIS, A.; LANUSSE, C. Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 32, n. 5, p. 536-544, 2004.

WALSH, T. K.; DONNAN, A. A.; JACKSON, F.; SKUCE, P. WOLSTENHOLME, A. J. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 304-312, 2007.

WANG, T.; MA, G.; ANG, C.; KORHONEN, P. K.; KOEHLER, A. V.; YOUNG, N. D.; NIE, S.; WILLIAMSON, N. A.; GASSER, R. B. High throughput LC-MS/MS-based proteomic analysis of excretory-secretory products from short-term in vitro culture of *Haemonchus contortus*. **Journal of Proteomics**, v. 204, p. 1-9, 2019.

WEBB, R.F., MCCULLY, C.H. Resistance of *Haemonchus contortus* to oxfendazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, p. 347-348, 1979.

WHITTAKER, J. H.; CARLSON, S. A.; JONES, D. E.; BREWER, M. T. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary

importance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 105–115, 2017.

WILLIAMSON, S. M.; STOREY, B.; HOWELL, S.; et al. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 2, p. 99–105, 2011.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 181–213, 1995.

WOOSTER, M. J.; WOODGATE, R. G.; CHICK, B. F. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 12, p. 840–842, 2001.

CAPÍTULO II

Avaliação de práticas sanitárias e detecção de mutações no gene da beta-tubulina em populações de *Haemonchus contortus* coletados no Oeste do Paraná, Brasil.

Evaluation of sanitary practices and detection of mutations in beta-tubulin gene in populations of *Haemonchus contortus* collected in the West of Paraná, Brazil

Carolina Melchior do Prado^{1,2}, Janaélia Ferreira Vasconcelos³, Gracielle Araujo Frota⁴, Douglas Luís Vieira², Jomar Patrício Monteiro^{3,4,5}, Marcelo Beltrão Molento^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

² Laboratório de Parasitologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

³ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário INTA – UNINTA, Sobral, CE, Brazil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil.

⁵ Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brazil.

1 RESUMO

Haemonchus contortus é o parasito mais patogênico em infecções gastrintestinais de pequenos ruminantes, pelo alto índice de mortalidade. O uso indiscriminado de drogas do grupo dos benzimidazóis (BZ) para o controle de *H. contortus* levou à seleção de populações resistentes. A resistência aos BZ está associada ao diagnóstico de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): F200Y, F167Y e E198A, encontrados no isotipo 1 do gene da beta-tubulina. O objetivo desse estudo foi identificar e analisar a frequência dos SNPs, que podem estar associados à resistência parasitária aos BZ, em *H. contortus* isolados de 18 propriedades (545 ovinos e 124 caprinos) na região Oeste do Paraná. Foram identificadas práticas de manejo sanitário que podem ser fatores de risco para o desenvolvimento da resistência nas propriedades. Amostras de fezes foram coletadas de animais distribuídos em oito municípios: Foz do Iguaçu; Matelândia; Medianeira; Ramilândia; Santa Terezinha de Itaipu; São Miguel do Iguaçu; Serranópolis do Iguaçu e Vera Cruz do Oeste. As propriedades foram georreferenciadas e os criadores responderam a um questionário sanitário. Foram feitas coproculturas por propriedade e as larvas de terceiro estágio (L3) foram identificadas e quantificadas. O DNA genômico foi obtido de amostras com 20.000 L3/propriedade e utilizado em ensaios de qPCR com iniciadores específicos para as mutações F200Y, F167Y e E198A de *H. contortus* para determinar as frequências de alelos sensíveis e resistentes. Foi feita análise de correlação entre as práticas sanitárias e os dados de qPCR por meio do teste ANOVA. *Haemonchus* spp. foi o parasito mais predominante em 67% das propriedades. Foram detectadas frequências de alelos resistentes de até 72.0% para F200Y e de 23.8% para F167Y. Apenas alelos sensíveis foram detectados para E198A. Práticas de manejo associadas à alta frequência de resistência foram encontradas nesse estudo, como: alta frequência de tratamentos (média de 6x/ano; 15/18), cálculo de dose por estimativa visual de peso (15/18), ausência de consórcio com outros herbívoros (14/18), tratamento de todos os animais do rebanho (14/18), ausência de quarentena (10/18) e baixa adesão do método FAMACHA (4/18). Esse é o primeiro estudo sistemático sobre práticas de manejo e detecção molecular da resistência para o grupo BZ, em ovinos e caprinos no Paraná. Conclui-se que os SNPs F200Y e F167Y estão presentes em populações de *H. contortus* do Oeste Paranaense e várias práticas de manejo presentes nessas propriedades podem favorecer o desenvolvimento de resistência.

Palavras-chave: Helmintos. Pequenos ruminantes. Resistência parasitária. Polimorfismos.

2 ABSTRACT

Haemonchus contortus is the most pathogenic parasite in gastrointestinal infections of small ruminants, due to the high mortality rate. The indiscriminate use of drugs of the benzimidazole (BZ) group for the control of *H. contortus* has led to the selection of resistant populations. Resistance to BZ is associated with the diagnosis of single nucleotide polymorphisms (SNPs): F200Y, F167Y and E198A, found in isotype 1 of the beta-tubulin gene. The aim of this study was to identify and analyze the frequency of SNP, which may be associated with parasitic resistance to BZ, in *H. contortus* isolated from 18 farms (545 sheep and 124 goats) in the western region of Paraná. Health management practices that can be risk factors for the development of resistance in the properties have been identified. Fecal samples were collected from animals from properties distributed in eight municipalities: Foz do Iguaçu; Matelândia; Medianeira; Ramilândia; Santa Terezinha de Itaipu; São Miguel do

Iguaçu; Serranópolis do Iguaçu and Vera Cruz do Oeste. The properties were georeferenced and the creators answered a herd-health questionnaire. Fecal cultures were made by property and the third stage larvae (L3) were identified and quantified. Genomic DNA was obtained from 20.000 L3/farm and used in qPCR assays with specific primers for the mutations F200Y, F167Y and E198A of *H. contortus* to determine the frequencies of sensitive and resistant alleles. Correlation analysis between health practices and qPCR data was performed using the ANOVA test. *Haemonchus* spp. was the most prevalent parasite in 67% of the properties. Resistant allele frequencies of up to 72.0% were detected for the SNP F200Y and 23.8% for the F167Y. Only sensitive alleles were detected for E198A. Management practices associated with high frequency of resistance, were found in this study, as: high frequency of treatments (average of 6x/year; 15/18), dose calculation by visual weight estimate (15/18), absence of intercropping with other herbivores (14/18), treatment of all animals in the herd (14/18), absence of quarantine (10/18) and low adhesion of the FAMACHA method (4/18). This is the first systematic study on management practices and molecular detection of resistance to BZ in sheep and goats in Paraná. It is concluded that the SNPs F200Y and F167Y are present in populations of *H. contortus* from Western Paraná and several management practices present in these properties can favor the development of resistance.

Keywords: Helminths. Small ruminants. Parasitic resistance. Polymorphisms.

3 INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes é relevante no Brasil, que possui um rebanho estimado em mais de 30 milhões de ovinos e caprinos. Desse quantitativo, o estado do Paraná (PR) representa cerca de 3% do rebanho ovino e 1% do rebanho caprino em 2019 (IBGE, 2019). Dentre os fatores que mais afetam a qualidade de vida de pequenos ruminantes, as de maior importância são as infecções por helmintos gastrintestinais, nas quais o parasito *Haemonchus contortus* é o mais prevalente e patogênico (NICIURA et al., 2012). Contudo, o uso indiscriminado de anti-helmínticos, o tratamento de todos os animais do rebanho, a alta frequência de tratamentos e a aplicação de doses incorretas no campo (PRICHARD et al., 1980; TORRES-ACOSTA et al., 2008), tornou esse parasito resistente à inúmeras classes de anti-helmínticos que são a base do seu controle (BALTRUSIS et al., 2018). Essa resistência na maioria dos casos é aceita como um fenômeno pré-adaptativo, em que os genes responsáveis pela resistência já existem, em baixa frequência, dentro da população, mas se tornam mais frequentes com a pressão de seleção feita com o uso frequente dos fármacos (TURNBULL et al., 2018). Além disso, em associação ao fator genético, a ocorrência desse fenômeno está intimamente relacionada a fatores de manejo. Dentre esses fatores, pode-se citar o manejo inadequado do pasto, ausência de quarentena de animais recém-adquiridos e tratamento indiscriminado, como já mencionado (CRUZ et al., 2010).

Os benzimidazóis (BZ) são uma das classes de anti-helmínticos mais utilizadas no controle das infecções por nematodas gastrintestinais no mundo (KRIZOVÁ-FORSTOVÁ et al., 2011). O seu mecanismo de ação consiste em sua ligação com o isotipo 1 da beta-tubulina, uma proteína monomérica e solúvel que constitui a estrutura básica dos microtúbulos. Ao se ligar de forma reversível no lugar da colquicina, os BZ atuam bloqueando a dimerização do isotipo 1 da beta-tubulina e, conseqüentemente, interferem na polimerização dos microtúbulos (LACEY, 1988). A resistência ao grupo BZ é caracterizada por várias mutações no isotipo 1 do gene que codifica a beta-tubulina (MOTTIER; PRICHARD, 2008). Estudos prévios determinaram que em *H. contortus* a resistência aos BZ está relacionada aos SNPs F200Y, F167Y e E198A (BARRÈRE et al., 2013).

No Brasil, já existem estudos utilizando o diagnóstico molecular da resistência. Niciura et al. (2012) concluíram um levantamento por meio de nested-PCR e ARMS-PCR, da frequência do SNP F200Y em 33 fazendas de ovinos no Estado de São Paulo (SP). Nesse estudo, foram encontradas frequências de genótipos homozigotos resistentes (RR) de 0.1 a 66.7% e alelos de resistência de 9 a 74%. No mesmo ano, Brasil et al. (2012) avaliaram, por meio de nested-PCR e sequenciamento, a frequência dos SNPs F200Y, F167Y e E198A em rebanhos de bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos distribuídos nos Estados de Minas Gerais (MG), SP e Santa Catarina (SC). O SNP F200Y não foi encontrado nos rebanhos bovinos, porém obteve frequência de até 27, 40 e 5% nos rebanhos ovinos, caprinos e bubalinos, respectivamente. O SNP F167 não foi encontrado no rebanho bubalino e foi de até 2.5; 32.5 e 27.5% nos rebanhos bovinos, ovinos e caprinos, respectivamente. O SNP E198A não foi detectado. Nunes et al. (2013) avaliaram a frequência do SNP F200Y em populações de *H. contortus* de rebanhos bubalinos, caprinos e ovinos dos Estados de MG e SP por meio da técnica de AS-PCR. Nesse estudo, a frequência média de alelos resistentes foi de 9% em caprinos, 7% em bubalinos e de 43% em ovinos. Santos et al. (2014) apresentaram o primeiro estudo no Brasil utilizando qPCR para detecção das mutações F200Y, F167Y e E198A. O estudo foi conduzido em 6 fazendas de ovinos no Ceará (CE), com frequências de até 36.4 e 92.7% para F200Y e F167Y, respectivamente. O SNP E198A resultou apenas na detecção de alelos sensíveis.

Chagas et al. (2016) determinaram as frequências do SNP F200Y em *H. contortus* isolados de fazendas de ovinos do Pará (PA). A frequência do genótipo RR foi de 30.8% e de alelos resistentes de 49%. Santos et al. (2017), realizaram um estudo com ovinos artificialmente infectados com larvas de terceiro estágio (L3) do isolado de *H. contortus* *Inbred-susceptible Edinburgh* (ISE) para detecção dos SNPs F200Y, F167Y e E198A por

meio de qPCR após seleção com oxfendazole (OXF) (grupo I), ivermectina (IVM) (grupo II) e a combinação dessas duas drogas (grupo III). Tanto os isolados dos grupos I e II apresentaram alta seleção para o SNP F167Y com frequências de 85.5 e 63%, respectivamente, enquanto os parasitos do grupo III apresentaram maior frequência do SNP F200Y (76.9%). Apenas alelos sensíveis foram observados no SNP E198A. No mesmo ano, Santos et al. (2017b) também realizaram a caracterização de resistência aos BZ por qPCR em *H. contortus* de ovinos do CE. Nesse estudo, pela primeira vez no Brasil, alelos resistentes do SNP E198A foram detectados, porém em baixíssimas frequências. Os SNPs F200Y e F167Y apresentaram frequências de até 64.5 e 78.4%, respectivamente. Lambert et al. (2017) determinaram por qPCR e genotipagem, as frequências dos SNPs F167Y e F200Y em populações de *H. contortus* de rebanhos caprinos na Bahia (BA). As frequências alélicas de F200Y e F167Y tiveram uma média de 42.2 e 50%, respectivamente para o alelo resistente.

No PR, estudos conduzidos por Thomaz-Soccol et al. (1996 e 2004) e Cunha Filho et al. (1998) avaliaram a eficácia de anti-helmínticos em seis, 42 e 10 rebanhos de ovinos, respectivamente, por meio do teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF). Em todos os estudos a resistência aos anti-helmínticos foi detectada. No estudo de Cunha Filho et al. (1998), 80% das propriedades não realizam rotação de pastagens e a frequência média de tratamentos era de oito vezes ao ano. No estudo de Thomaz-Soccol et al. (2004) os rebanhos possuíam de 50 a 250 ovinos que eram criados em sistema semi-intensivo, tratados com anti-helmínticos de 6 a 12 vezes/ano e em algumas propriedades havia rotação de drogas. Contudo, os mecanismos moleculares associados a resistência aos BZ ou outras drogas, não foram pesquisados em ovinos e caprinos no estado.

A PCR quantitativa (qPCR) é uma metodologia que permite a detecção de SNPs com alta sensibilidade e especificidade, a nível de 1% na população parasitária (ELMAHALAWY et al., 2018). Seu uso em associação a análise de práticas sanitárias pode refletir em manejos de prevenção e controle da haemoncose mais eficientes e que atrasam o aparecimento de alterações fenotípicas e, consequentemente, do estabelecimento da resistência (Veríssimo et al., 2012). O uso dessa ferramenta para detecção dos SNPs F200Y, F167Y e E198A já foi feito no CE (SANTOS et al., 2014, 2017, 2017b) e na BA (LAMBERT et al., 2017). Contudo, com exceção do estudo de Lambert et al. (2017) no qual nenhuma associação entre frequências dos SNPs e características de manejo foram observadas, a correlação de dados de qPCR com manejo ainda não foram feitas.

O objetivo desse trabalho foi identificar os polimorfismos associados à resistência parasitária aos BZ em *H. contortus* isolados de pequenos ruminantes e identificar práticas de

manejo que possam estar associadas ao desenvolvimento da resistência em propriedades rurais da região Oeste do PR.

4 MATERIAL E ÁREA DE ESTUDO

4.1 AMOSTRAGEM

No período de novembro de 2020, amostras de população parasitária foram obtidas de 545 ovinos e 124 caprinos, selecionados ao acaso, provenientes de 18 propriedades, selecionadas ao acaso, distribuídas em oito municípios da região Oeste do Estado do PR (FA, Foz do Iguaçu; MA, Matelândia; ME, Medianeira; RM, Ramilândia; ST, Santa Terezinha de Itaipu; SM, São Miguel do Iguaçu; SI, Serranópolis do Iguaçu e VC, Vera Cruz do Oeste) (FIGURA 4). Nessas propriedades, o sistema de produção mais frequente era o semi-intensivo, com animais no pasto durante o dia e em apriscos no período da noite. Três propriedades criavam ovinos e caprinos, uma exclusivamente caprinos e todas as outras apenas ovinos.

A área de cada município, seu número de habitantes e a população de ovinos e caprinos podem ser observados na TABELA 1. De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger a região possui clima subtropical com temperatura média anual de 24 °C e duas estações distintas que consistem em um verão úmido e quente e um inverno seco e frio. Todos os municípios estão inseridos no bioma Mata Atlântica (IBGE, 2017). Com exceção de Foz do Iguaçu que tem como principal atividade econômica o turismo (FOZ DO IGUAÇU, 2020), os demais municípios têm sua economia baseada no agronegócio de bovinocultura e plantações de soja e milho (IBGE, 2017) (TABELA 1).

- 5) Como era o manejo de animais recém-adquiridos antes da introdução no rebanho: Se eram tratados e isolados por alguns dias; apenas isolados por alguns dias; tratados e introduzidos sem isolamento; introduzidos sem tratamento e isolamento.
- 6) Como era feito tratamento com anti-helmíntico: Todos os animais do rebanho; somente alguns animais ou lotes; com base no exame de fezes; em animais com sinais clínicos de verminose; estratégica (2 x por ano/seca); semestral.
- 7) Qual era a frequência de tratamentos por ano;
- 8) Se e como era feita a rotação de anti-helmínticos: A cada tratamento; de acordo com teste de eficácia; quando o produto não faz mais efeito; de acordo com orientação do veterinário; sem critério; nunca trocou.
- 9) Quais classes de anti-helmínticos eram utilizadas;
- 10) Como era feito o cálculo de dose do anti-helmíntico para cada animal: Pesagem; Fita de peso; Estimativa visual.
- 11) Se era feito rotação de pastagens e/ou FAMACHA.

4.3 COLETA DE FEZES E COPROCULTURA

Fezes foram coletadas de pelo menos 50% dos animais de cada rebanho e em rebanhos com mais de cem animais, ao menos 50 animais foram amostrados. As amostras foram armazenadas por propriedade e utilizadas para a realização de culturas para a obtenção de L3. Os animais obedeciam ao manejo local, não sendo necessário a retirada do tratamento antiparasitário nas propriedades.

Para a coprocultura, seguiu-se protocolo de Roberts & O'Sullivan (1950). As amostras de cada propriedade foram colocadas em frasco de vidro de 500 mL com boca larga, adicionou-se vermiculite comercial e misturou-se com o auxílio de uma espátula até obter um composto homogêneo que ocupasse 2/3 do volume do frasco. Realizou-se a umidificação da mistura e o frasco foi coberto com uma placa de Petri e um barbante para permitir a aeração. O cultivo ocorreu em temperatura ambiente ($\geq 22^{\circ}\text{C}$) por 10 dias. Após esse período, o frasco foi completado com água morna (30°C) e invertido sobre uma placa de Petri. Adicionou-se água morna na placa de Petri e após 6 h, o conteúdo da placa foi aspirado com pipeta Pasteur. A suspensão foi armazenada em frascos de 100 mL e acondicionada a 4°C até a realização da quantificação e do teste molecular.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E QUANTIFICAÇÃO DAS L3

A suspensão de L3 foi centrifugada a 6.000 g por 2 min para sua concentração. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o líquido restante foi homogeneizado. Pipetou-se sobre a lâmina, uma alíquota de 10 µL da solução de L3 e acrescentou-se 10 µL de Lugol e lamínula sobre cada alíquota. Em seguida, procedeu-se à contagem das L3 em microscópio e foi feito uma média de três contagens. Ao menos, 100 L3 de cada coprocultura passaram por processo de quantificação e identificação quanto ao seu gênero ou espécie conforme descrição de van Wyk & Mayhew (2013). O pool amostras que apresentaram ao menos 60% de *Haemonchus* spp. foram selecionadas para os estudos moleculares.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA genômico de *Haemonchus* spp., utilizou-se protocolo padronizado por Santos et al. (2014). Em tubos de 2,0 mL contendo amostras de 20.000 L3 de *H. contortus* de cada propriedade, foi adicionado 1 mL de esferas de zircônia de 1.0 mm. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de tampão de lise (0,2% de SDS; 50 mM de EDTA; 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, RNase a 100 µg/mL e Proteinase K a 0,4 mg/mL). As amostras foram homogeneizadas com Mini-BeadBeater-16 (BioSpec, Bartlesville, US) por 2 min (quatro ciclos de 30 segundos). O lisado foi transferido para novo tubo de 1,5 mL e incubados em banho-seco a 56 °C por 1 h. Foi adicionado 1 volume de acetato de potássio a 5 M e homogeneizou-se. As amostras foram incubadas em gelo por 2 h e centrifugadas a 15.700 x g por 15 min. O sobrenadante foi passado para um novo tubo no qual acrescentou-se 1 volume de isopropanol absoluto refrigerado. Centrifugou-se a 15.700 x g por 30 min e o sobrenadante foi descartado, deixando apenas o pellet. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de TE (1 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl, pH, 8,0) e homogeneizadas. Adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se. Centrifugou-se a 15.700 x g por 15 min (4 °C). Transferiu-se a fase superficial (aquosa) para novo tubo. Acrescentou-se 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se. Centrifugou-se a 15.700 x g por 15 min (4 °C). Transferiu-se a fase aquosa para novo tubo e adicionou-se 1 volume de isopropanol absoluto. As amostras foram centrifugadas a 15.700 x g por 30 min (4 °C) e todo o sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 100 µL de etanol a 70% refrigerado. Centrifugou-se a 15.700 x g por 15 min (4 °C). Descartou-se o sobrenadante. O pellet foi secado em banho-seco a 37 °C. Adicionou-se entre 20 a 200 µL de TE (1 mM de EDTA, 10

mM de Tris-HCl, pH, 8,0) e homogeneizou-se para ressuspensão do DNA. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até a utilização. A quantidade de DNA extraído foi determinada por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US).

4.6 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Todos os testes foram feitos em triplicatas com primers específicos para os SNPs F200Y, F167Y e E198A de *H. contortus* (TABELA 2) de acordo com Santos et al. (2014). Ensaio de qPCR foram realizados com DNA extraído das amostras de L3 por propriedade. As reações foram feitas com 12.5 µL 2x Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (Roche, West Sussex, UK), 0.3 pmol/µL de cada iniciador (forward e reverse), 25 ng de DNA e água para completar um volume total de 25 µL. Foram feitos controles negativos com água no lugar do DNA e como controle positivo do alelo sensível utilizou-se o isolado de laboratório ISE (*Inbred-susceptible-Edinburgh*). Condições de amplificação para os SNPs F200Y e F167Y foram: 95 °C por 10 min e 35 ciclos a 95 °C por 15 s e a 58 °C por 30 s. A amplificação do SNP E198A, usou apenas 34 ciclos nas mesmas condições de temperatura já descritas. Análises da curva de dissociação foram feitas para detecção de dímeros de primer (SANTOS et al., 2014).

TABELA 2 – INICIADORES (R = REVERSE; F = FORWARD) UTILIZADOS PARA DETECTAR OS SNPs F200Y, F167Y E E198A DE ALELO SENSÍVEL E RESISTENTE DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* E SEUS RESPECTIVOS TAMANHOS EM PARES DE BASES (PB).

Iniciadores	Sequência 5' – 3'	pb.	Alelo
200R2	CAGAGCTTCGTTGTCAATACAGA	145	Sensível
200R1	CAGAGCTTCGTTGTCAATACAGT	193	Resistente
200F2	CTACCCCTTTCCGTCCATCAA	294	Ambos
167F1	CCTGATAGAATTATGGCTTCGTT	371	Sensível
167F2	CCTGATAGAATTATGGCTTCGTA	412	Resistente
167R1	GATCTCACCTTGGGTGATGG	744	Ambos
198R1	CTTCGTTGTCAATACAGAATGTTT	144	Sensível
198R2	CTTCGTTGTCAATACAGAATGTTG	194	Resistente
198F1	GAAGATGTTTAAAGGTATCCGACACT	294	Ambos

FONTE: Santos et al. (2014).

4.7 ANÁLISE DE DADOS DA qPCR

O ciclo em que a fluorescência detectada estava acima do ruído de fundo (C_q) para cada reação de qPCR foi determinado pelo software Realplex 2.2 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e as frequências de alelos foram estimadas pela fórmula anteriormente descrita por Germer et al. (2000). Nos casos onde não foi possível determinar o valor de C_q para um alelo,

sua frequência foi zerada e a frequência de sua contraparte detectada foi de aproximadamente 100%. As populações de parasitos foram consideradas resistentes, quando o percentual de *H. contortus* resistente foi superior a 10%, conforme estimado pelo quadro das frequências alélicas resistentes em cada locus, e assumindo que as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (BARRÈRE et al., 2013). O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um teorema que afirma que a variação genética em uma população permanecerá constante de uma geração para outra, na ausência de fatores perturbadores (ex. o tratamento dos animais com anti-helmínticos).

4.8 ESTATÍSTICA DESCRITIVA E CORRELAÇÃO DOS DADOS DO MANEJO E DA qPCR

A análise estatística foi realizada no software “R” de distribuição livre (www.r-project.org) na versão i388 4.0.2. Inicialmente foi realizada uma análise estatística descritiva que tem por finalidade visualizar o comportamento dos dados do questionário das propriedades quanto à frequência de resistência parasitária associada as mutações F200Y e F167Y. Foram construídos gráficos de pontos (dotplots) para as mutações F200Y e F167Y pela frequência com que os animais foram tratados e pela forma de dosagem do anti-helmíntico.

A associação entre a frequência de alelos resistentes dos SNPs F200Y e F167Y e a estatística descritiva das práticas de manejo foram primeiramente analisadas pelo teste de Levene para determinar se a relação entre as variáveis de manejo e a frequência dos SNPs possuíam a mesma variância ($P > 0,05$). Em seguida, foi feito o teste de Shapiro-Wilk para testar se as frequências dos SNPs possuíam uma distribuição normal ($P > 0,05$). Nas análises com $p > 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk foi feita análise de variância pelo teste ANOVA para verificar se havia diferença entre as médias das variáveis e considerado estatisticamente significativo quando $P \leq 0,05$.

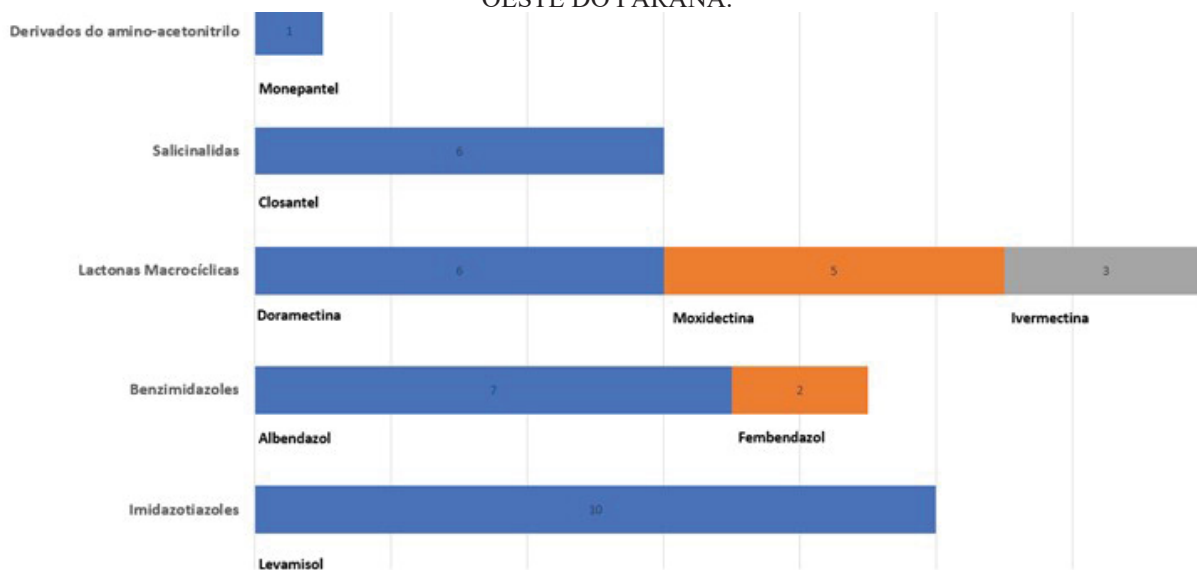
5 RESULTADOS

5.1 PRÁTICAS DE MANEJO E CONTROLE PARASITÁRIO NO REBANHO

Dos 18 respondentes, o tempo de atividade do produtor na criação de pequenos ruminantes variou de 3 meses a 30 anos (média de 8.5 anos). O número de animais em cada

rebanho variou de sete a 288 (média = 94). Dez (55.5%) propriedades tinham seu rebanho composto por ovinos mestiços e das quatro propriedades que criavam caprinos, todos os animais eram da raça Boer. Dezesete (94.4%) das propriedades estudadas, seguem um sistema de produção semi-intensivo. A técnica de rotação de pastagem, na qual os animais são relocados para um novo pasto após tratamento com anti-helmíntico, foi realizada em 45% dos rebanhos. Levamisol (LEV) e albendazol, que é uma droga da família dos BZ, foram utilizados, respectivamente em 55.5 e 38.8% das propriedades. O uso de outras classes de anti-helmínticos e seus respectivos representantes podem ser observados no GRÁFICO 1. Em 22.2% das propriedades, bovinos e/ou equinos dividiam o mesmo pasto que ovinos. O método FAMACHA foi utilizado em apenas 22.2% dos rebanhos. Nenhum produtor utilizou recursos laboratoriais para decidir quanto ao controle parasitário. Outros dados de manejo podem ser observados na TABELA 3.

GRÁFICO 1 – RELAÇÃO DE CLASSES DE ANTI-HELMÍNTICOS E SEUS RESPECTIVOS REPRESENTANTES ADOTADAS POR 18 PRODUTORES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.



FONTE: A autora (2021).

TABELA 3 – DADOS DE FREQUÊNCIA (%) DAS MEDIDAS SANITÁRIAS ADOTADAS POR 18 PRODUTORES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.

Manejo	Opção de resposta	Freq. (%)
Dose de anti-helmíntico	Estimativa visual do peso	83.3
	Pesagem com balança	16.7
Animais recém-adquiridos	Tratados e mantidos em quarentena	44.4
	Misturados sem isolamento e tratamento	33.3
	Tratados e misturados sem quarentena	22.2
Tratamento anti-helmíntico	Todos os animais	77.8
	Com sinais clínicos e uso de FAMACHA	22.2
Frequência de tratamentos/ano	1x	5.5
	2x	11.1
	3x	5.5
	4x	22.2
	6x	16.7
	12x	22.2
Rotação de anti-helmínticos	A cada tratamento	44.4
	Nunca trocou	27.7
	Quanto o produto não possuía mais efeito	11.1
	Por orientação do veterinário	5.5
	1x por ano	5.5
	Sem critério	5.5

FONTE: A autora (2021).

5.2 FREQUÊNCIA MÉDIA DE GÊNEROS DE NEMATODAS

Haemonchus spp. (66.6%) e *Trichostrongylus* spp. (55.5%) foram os parasitos mais prevalentes em todas as propriedades avaliadas (TABELA 4). Infecções por *Teladorsagia* spp. e *Cooperia* spp. também estavam presentes em duas propriedades. A propriedade de Vera Cruz do Oeste teve resultado negativo para quaisquer parasitos.

TABELA 4 – NÚMERO DE ANIMAIS (O = OVINOS E C = CAPRINOS) AMOSTRADOS POR PROPRIEDADE E IDENTIFICAÇÃO DE GÊNERO E FREQUÊNCIA (%) DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE PARASITOS GASTRINTESTINAIS NA MICRORREGIÃO DE FOZ DO IGUAÇU.

Propriedade ^a	Nº de amostras	Quant. L3 (2 ml)	Frequência L3 (%)			
			<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Cooperia</i>
FI1	O = 50	266	100	0.	0	0
MA1	O = 50	1466	100	0	0	0
ME1	O = 25 / C = 25	6466	100	0	0	0
RM1	O = 50	666	100	0	0	0
ST1	O = 19	266	0	100	0	0
ST2	O = 18	866	77	23	0	0
ST3	O = 50	4866	85	12	3	0
ST4	O = 9	466	100	0	0	0
ST5	O = 18	1933	86	14	0	0
ST6	O = 5	1133	0	100	0	0
ST7	O = 10 / C = 40	2800	0	100	0	0
SM1	O = 45	2133	97	0	0	3
SM2	C = 50	333	0	100	0	0
SM3	O = 11 / C = 9	2866	0	100	0	0
SM4	O = 35	4733	100	0	0	0
SI1	O = 50	2266	91	9	0	0
SI2	O = 50	3066	80	20	0	0

FONTE: A autora (2021).

LEGENDAS: ^a Municípios: FI, Foz do Iguaçu; MA, Matelândia; ME, Medianeira; RM, Ramilândia; ST, Santa Terezinha de Itaipu; SM, São Miguel do Iguaçu; SI, Serranópolis do Iguaçu.

5.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Doze propriedades foram identificadas para a avaliação molecular com base no critério de amostras que apresentaram ao menos 60% de *Haemonchus* spp. na média da quantificação. Os resultados da PCR quantitativa mostraram frequências de alelos resistentes de até 72.0 e 23.8% para os SNPs F200Y e F167Y, respectivamente (TABELA 5). Os isolados das propriedades ST4 e SI2, apresentaram as maiores frequências de alelos resistentes no SNP F200Y com 72 e 63.5%, respectivamente. Os isolados das propriedades SI1 e RM1 mostraram as maiores frequências de alelos resistentes F167Y com respectivamente, 23.8 e 20.7%. Todas as populações estudadas apresentaram frequências de nematodas resistentes acima de 10% para F200Y, com uma variação de 46.4% a 72%. Nove populações apresentaram frequência acima de 10% para o SNP F167Y com uma variação de 15.7% a 23.8%. Três propriedades apresentaram frequências de 5.7, 8.1 e 8.3% para F167Y. O SNP E198A resultou apenas na detecção de alelos sensíveis para todos os isolados. O isolado ISE apresentou 100% de frequência de alelos sensíveis para os SNP (TABELA 5). A análise da curva de dissociação resultou em apenas um pico bem definido por reação, indicando que apenas um produto de PCR foi amplificado.

TABELA 5 – MÉDIA DE C_qs DA qPCR E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs F200Y, F167Y E E198A DE AMOSTRAS DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁGIO (L3) DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM FAZENDAS DE CRIAÇÃO DE OVINOS E CAPRINOS, DO OESTE DO PARANÁ.

Isolado ^a	SNP F200Y				SNP F167Y				SNP E198A	
	C _q ^b alelos		% cada alelo		C _q alelos		% cada alelo		C _q cada alelo	
	S ^c	R ^d	S	R	S	R	S	R	S	R ^e
ISE	22.7	31.1	100	-	23.5	-	-	-	23.8	-
FI1	29.9	30.1	53.6	46.4	29.3	33.3	94.3	5.7	31.6	-
MA1	25.5	25.6	52.2	47.7	24.9	26.9	79.8	20.2	26.4	-
ME1	25.0	25.1	49.8	50.2	24.3	26.7	84.0	16.0	26.1	-
RM1	29.4	29.2	46.2	53.8	28.5	30.4	79.3	20.7	29.8	-
ST2	24.3	23.9	42.8	57.2	23.1	25.3	82.5	17.5	25.2	-
ST3	24.8	24.8	49.8	50.2	23.6	25.8	82.0	18.0	25.6	-
ST4	28.3	26.9	28.0	72.0	25.9	29.4	91.8	8.1	27.1	-
ST5	26.4	26.5	53.3	46.7	25.5	27.7	81.8	18.2	27.3	-
SM1	28.5	28.3	47.2	52.8	27.7	29.5	83.2	16.8	28.7	-
SM4	29.2	28.6	39.1	60.9	27.7	30.1	84.2	15.7	29.1	-
SI1	25.2	25.2	49.8	50.2	24.7	26.3	76.2	23.8	25.8	-
SI2	26.4	25.6	36.5	63.5	24.4	27.8	91.6	8.3	27.0	-

FONTE: A autora (2021).

LEGENDAS: ^a FI, Foz do Iguaçu; MA, Matelândia; ME, Medianeira; RM, Ramilândia; ST, Santa Terezinha de Itaipu; SM, São Miguel do Iguaçu; SI, Serranópolis do Iguaçu. ^b Média do C_q (ciclo de quantificação) das triplicatas. ^c Sensível. ^d Resistente. ^e Nos casos onde não foi possível determinar o valor de C_q para um

determinado alelo, sua frequência foi zerada e a frequência de sua contraparte detectada foi de aproximadamente 100%.

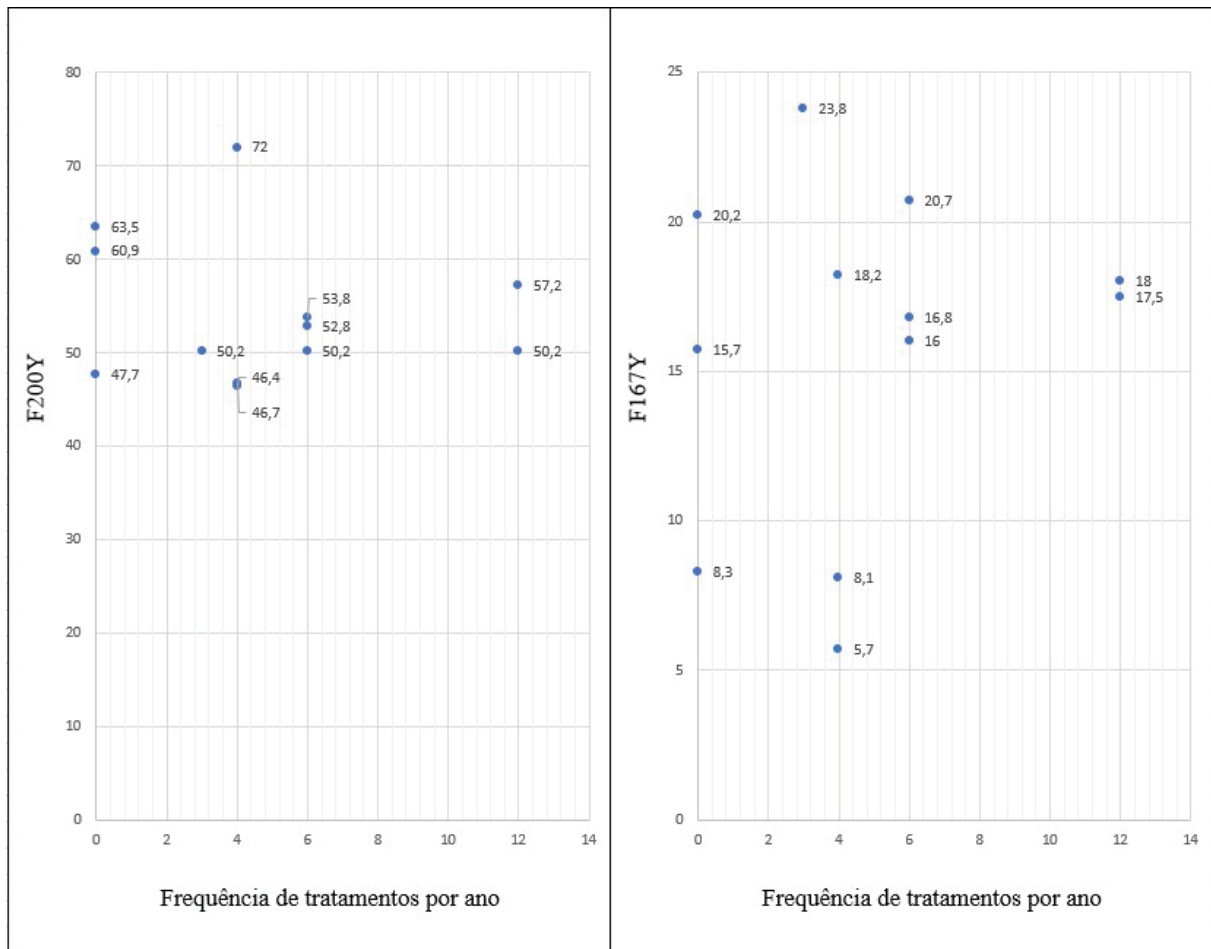
5.4 ESTATÍSTICA DESCRITIVA E CORRELAÇÃO DO MANEJO E DA qPCR

Na GRÁFICO 2 pode-se verificar que referente a ambas as mutações (F200Y e F167Y), nas 12 propriedades, o maior número de vezes que a frequência com que os tratamentos foram aplicados foi: em três propriedades com frequência de 4 vezes (25%), em 3 propriedades a frequência era de 6 vezes (25%) e em três propriedades (25%) não houve uma frequência. Conforme observado no GRÁFICO 2, todas as propriedades apresentaram frequências de alelos resistentes do SNP F200Y superiores a 40%, com uma média de 54.3%, o que se considera uma alta frequência para resistência.

Em relação ao SNP F167Y, as propriedades FA1, ST4 e SI2, localizadas nos municípios de Foz do Iguaçu, Santa Terezinha de Itaipu e Serranópolis do Iguaçu, respectivamente, apresentaram frequências inferiores a 10%. Esse dado, conforme estimado pelo quadro das frequências alélicas de Barrère et al. (2013), caracteriza uma população de isolados sensíveis. Nessas propriedades a única característica em comum foi que todos os animais eram de raças mestiças. No que se refere as nove propriedades com frequências de alelos superiores a 10%, conforme observado no GRÁFICO 2, as mesmas não foram superiores a 40%, com uma média de 18.5%, o que caracteriza uma baixa frequência de isolados resistentes. A propriedade com maior frequência de alelos resistentes do SNP F167Y tratava os animais três vezes por ano. Na propriedade com menor frequência de alelos resistentes para ambos os SNP, o tratamento com anti-helmíntico era feito quatro vezes por ano.

Como foram detectados apenas alelos sensíveis do SNP E198A, assim, a correlação de suas frequências nas 12 propriedades com os dados do manejo não foi realizada.

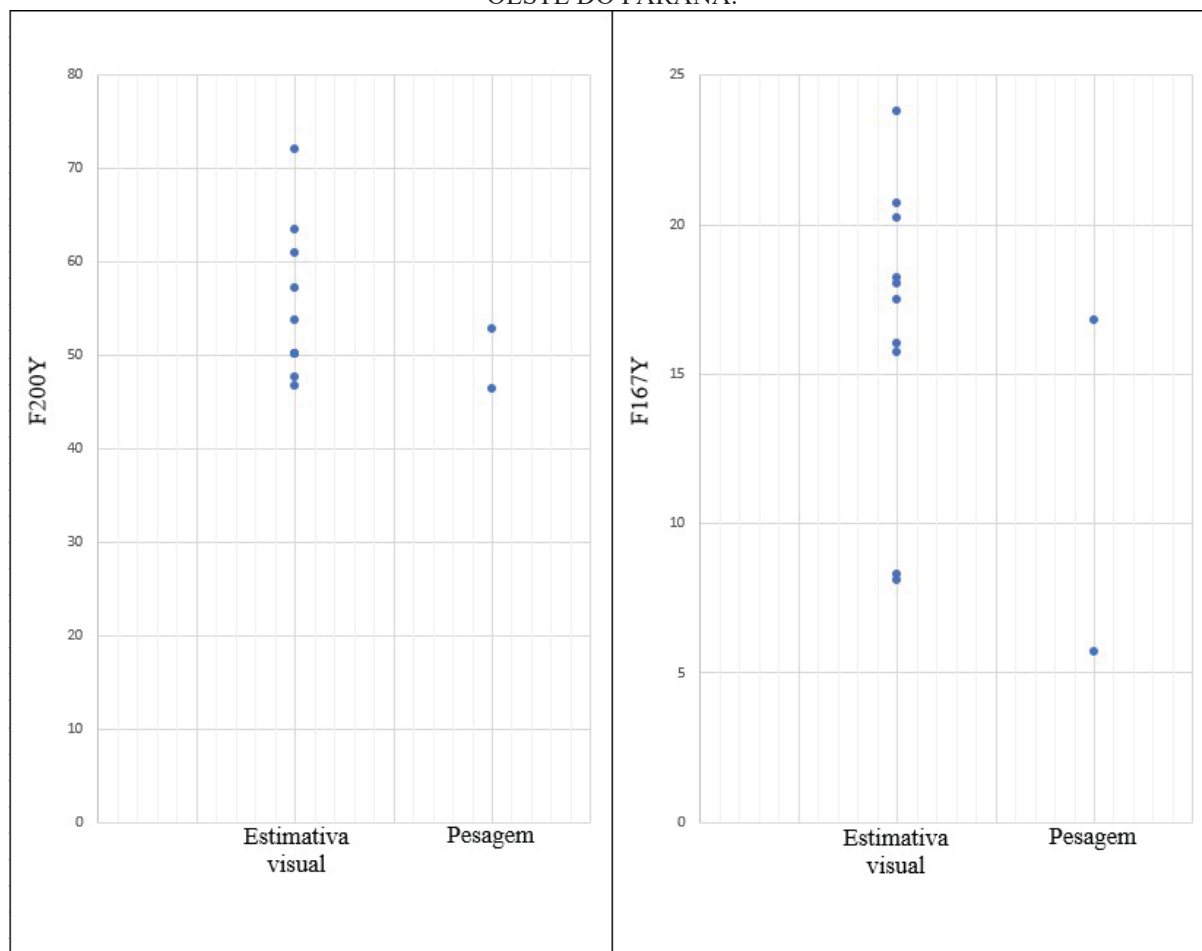
GRÁFICO 2 – FREQUÊNCIA (%) DAS MUTAÇÕES F200Y E F167Y COM O NÚMERO DE TRATAMENTOS COM ANTI-HELMÍNTICOS POR ANO NAS PROPRIEDADES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ. O VALOR ZERO (0) REPRESENTA PROPRIEDADES SEM FREQUÊNCIA DE TRATAMENTOS.



FONTE: A autora (2021).

No GRÁFICO 3, vê-se que tanto na mutação F200Y quanto na mutação F167Y em 10, ou seja, 83% das propriedades o cálculo da dose foi realizado por estimativa visual. Com relação a forma de dosagem de anti-helmínticos, a propriedade com menor frequência de alelos resistentes dos SNPs F200Y e F167Y fazia o cálculo da dose por meio de pesagem dos animais. Enquanto que, as com maior frequência de alelos resistentes desses polimorfismos faziam o cálculo por meio de estimativa visual (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 – CORRELAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA (%) DOS SNPs F200Y E F167Y COM A FORMA DE DOSAGEM DE ANTI-HELMÍNTICOS NAS PROPRIEDADES DE OVINOS E CAPRINOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.



FONTE: A autora (2021).

Os valores mínimos e máximos, bem como, a média, mediana e desvio padrão das frequências de alelos resistentes dos SNPs F200Y e F167Y em cada uma das categorias avaliadas, dentro das práticas de manejo, podem ser observadas na TABELA 6 e 7.

TABELA 6 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA (%) E DESVIO PADRÃO (DP) DAS PRÁTICAS DE MANEJO SANITÁRIO PARA OVINOS E CAPRINOS, OBTIDAS POR MEIO DOS QUESTIONÁRIOS AOS PROPRIETÁRIOS E FREQUÊNCIAS DE ALELOS RESISTENTES DE F200Y, NO OESTE DO PARANÁ.

Variáveis	Categorias	Estatísticas descritiva mutação para F200Y					N
		Mínimo	Média	Mediana	DP	Máximo	
Pasto com outras espécies	Sim	46.4	50.1	50.1	5.2	53.8	2
	Não	46.7	55.1	51.5	8.1	72.0	10
Manejo de animais recém-adquiridos	Misturados sem tratamento e isolamento	50.2	51.4	50.2	2.1	53.8	3
	Tratados e isolados	46.4	52.6	49.0	7.6	63.5	6
	Tratados e misturados sem isolamento	52.8	60.7	57.2	10.1	72.0	3
	Em animais com sinais clínicos	46.4	51.7	47.7	8.0	60.9	3
Tratamento	Todos os animais do rebanho	46.7	55.2	52.8	8.0	72.0	9
Uso BZ	Sim	46.4	52.5	50.2	5.9	60.9	6
	Não	46.7	56.1	53.3	9.8	72.0	6
Uso de outras drogas	Sim	46.4	52.2	51.5	4.6	60.9	9
	Não	46.7	60.7	63.5	12.9	72.0	3
Rotação de pasto	Sim	46.7	53.1	50.2	7.1	63.5	5
	Não	46.4	55.2	52.8	8.7	72.0	7
FAMACHA	Sim	46.4	51.7	47.7	8.0	60.9	3
	Não	46.7	55.2	52.8	8.0	72.0	9

FONTE: A autora (2021).

TABELA 7 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA (%) E DESVIO PADRÃO (DP) DAS PRÁTICAS DE MANEJO SANITÁRIO PARA OVINOS E CAPRINOS, OBTIDAS POR MEIO DOS QUESTIONÁRIOS AOS PROPRIETÁRIOS E FREQUÊNCIAS DE ALELOS RESISTENTES DE F167Y, NO OESTE DO PARANÁ.

Variáveis	Categorias	Estatísticas descritiva mutação para F167Y					N
		Mínimo	Média	Mediana	DP	Máximo	
Pasto com outras espécies	Sim	5.7	13.2	13.2	10.6	20.7	2
	Não	8.1	16.3	17.1	4.8	23.8	10
Manejo	Misturados sem tratamento e isolamento	18.0	20.8	20.7	2.9	23.8	3
	Tratados e isolados	5.7	14.0	15.9	5.7	20.2	6
Tratamento	Tratados e misturados sem isolamento	8.1	14.1	16.8	5.2	17.5	3
	Somente com sinais clínicos	5.7	13.9	15.7	7.4	20.2	3
	Todos os animais	8.1	16.4	17.5	5.2	23.8	9
Uso de BZ	Sim	5.7	16.1	16.8	5.9	23.8	6
	Não	8.1	15.4	17.5	5.7	20.7	6
Uso de outras drogas	Sim	5.7	17.2	17.5	5.0	23.8	9
	Não	8.1	11.5	8.3	5.8	18.2	3
Rotação pasto	Sim	8.3	16.0	17.5	4.6	20.2	5
	Não	5.7	15.5	16.8	6.5	23.8	7
FAMACHA	Sim	5.7	13.9	15.7	7.4	20.2	3
	Não	8.1	16.4	17.5	5.2	23.8	9

FONTE: A autora (2021).

Os resultados do teste de Levene determinaram que a relação entre as variáveis de manejo e frequência das mutações possuíam a mesma variância ($P > 0,05$) e, portanto, não foram estatisticamente relevantes em nenhuma das relações. No teste de Shapiro-Wilk, as frequências do SNPs F200Y e F167Y apresentaram distribuição normal ($P = 0.089$ e 0.166), porém todas as análises de variância entre as variáveis de manejo e esses SNPs, feitas pelo teste ANOVA não foram estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Esse estudo é a primeira pesquisa com foco na detecção molecular de resistência aos BZ em pequenos ruminantes no PR. Ao todo, 18 propriedades foram avaliadas quanto as práticas de manejo e 12 foram selecionadas para o estudo molecular.

Neste estudo, nenhuma prática de manejo foi estatisticamente associada com a alta frequência de alelos resistentes do polimorfismo F200Y. Alta resistência foi assumida quando

a frequência de alelos resistentes era maior do que 40%, conforme determinado por Niciura et al. (2012). Da mesma forma, a associação entre tais práticas e a frequência em menor grau de alelos resistentes do SNP F167Y também não foi estatisticamente relevante. Esse dado pode ser consequência do baixo número amostral e da alta frequência de resistência do SNP F200Y mesmo em propriedades com manejos muito distintos. A busca por fatores de risco no manejo sanitário e a associação com a resistência parasitária é escassa no Brasil. Chagas et al. (2016) avaliaram molecularmente a resistência de *H. contortus* em 12 propriedades de ovinos no PA e realizaram questionários sobre o manejo sanitário com o objetivo de apenas demonstrar algumas características das propriedades de ovinos e de suas práticas na região. Santos et al. (2017b) caracterizaram as práticas de manejo de rebanho e detectaram frequências de alelos dos SNPs F200Y, F167Y e E198A em 20 propriedades de ovinos do CE, porém a associação desses dois dados também não foi realizada. Lambert et al. (2017) buscaram associar, por meio do teste de Qui-quadrado, práticas sanitárias com a frequência de alelos resistentes de F200Y e F167Y em *H. contortus* em 29 propriedades de caprinos da BA, contudo nenhuma associação foi observada ($P = 0.435$). Estudo feito por Niciura et al. (2012) em 33 propriedades de ovinos no Estado de SP associou a alta frequência de genótipos resistentes a fatores de risco no manejo, sendo eles: 1) propriedades com poucos anos de atividade; 2) propriedade com animais da raça Dorper e Suffolk e mestiços; 3) uso de rotação de pastagens; 4) manter ovinos no mesmo pasto que bovinos e/ou equinos; 5) tratamento de todos os animais com anti-helmíntico; 6) rotação de anti-helmínticos a cada tratamento e 7) cálculo de dose por estimativa visual de peso dos animais. Essa informação pode significar que estudos com mais propriedades nessa e em outras regiões do PR, ainda são necessários para a determinação desses fatores de risco no Estado.

Com relação às práticas de manejo é interessante observar que mesmo em propriedades onde não se fazia o uso de BZ, a resistência foi encontrada em frequências altas (F200Y) e moderadas (F167Y). Esse fato pode ser explicado de duas formas. Primeiramente, Mottier e Prichard et al. (2008) relataram que o uso de IVM e moxidectina (MOX) selecionam mudanças que alteram a frequência dos alelos da beta-tubulina e para os SNPs F200Y, F167Y e E198A em *H. contortus*. Outro estudo feito por Santos et al. (2017), utilizando grupos de ovinos tratados com IVM determinou que o uso dessa droga aumentou a frequência de alelos F200Y e F167Y. Em segundo lugar, outro fator que pode explicar esse dado é a falta de quarentena nas propriedades. Com a alta prevalência de resistência anti-helmíntica em inúmeros rebanhos, a probabilidade de que animais recém-adquiridos (que muitas vezes chegam a nova propriedade sem informações sobre o manejo parasitário

realizado na propriedade de origem) carreguem parasitos resistentes é muito alta. Consequentemente, a aplicação de uma quarentena eficaz é amplamente defendida (LEATHWICK et al., 2009).

Neste estudo, as 12 propriedades selecionadas para o estudo molecular apresentaram alta frequência de resistência para o SNP F200Y, o que pode determinar que a refugia não está mais presente nesses rebanhos. Em consequência a esse fator, deve-se ressaltar que era esperado que nenhuma prática de manejo fosse associada a essa alta frequência de resistência. Nesse contexto, o uso de quarentena com isolamento de animais recém-adquiridos por 30 a 60 dias e tratamento desses com anti-helmínticos, talvez seja o ponto-chave na melhoria das condições relacionadas ao controle da resistência no rebanho ao longo dos anos. Entretanto, a melhor forma de empregar essa estratégia é complexa e deve ser avaliada com cautela de caso a caso, considerando as condições pré-existentes na propriedade.

A qPCR é um método efetivo para a avaliação da resistência aos BZ em ruminantes por caracterizar uma população resistente quando a frequência de alelos resistentes é superior a 10% e permite a detecção da resistência de forma mais precoce quando comparada a métodos fenotípicos. É um método de alta sensibilidade para detecção de alelos sensíveis e resistentes dos polimorfismos F200Y e F167Y em isolados de campo de *H. contortus*. O uso da qPCR permitiu determinar as frequências alélicas do isotipo 1 da beta-tubulina para todos os SNPs relacionados à resistência aos BZ e a diferenciação entre o isolado ISE e os isolados de campo no PR. A frequência de alelos resistentes do SNP F200Y no presente estudo foi maior do que a relatada em estudos prévios em outras regiões do Brasil (TABELA 8). Contudo, vale ressaltar que a qPCR não permite a diferenciação de genótipos RR para heterozigoto resistente (SR) e fornece uma resposta diferente do que outras técnicas genotípicas. Logo, a associação com outras metodologias de detecção molecular e com técnicas fenotípicas são amplamente recomendadas.

TABELA 8 – FREQUÊNCIA (%) ALÉLICA MÉDIA DO SNP F200Y DE *HAEMONCHUS* spp. ENCONTRADAS EM RUMINANTES (N = AMOSTRAS), REALIZADAS COM VÁRIAS TÉCNICAS MOLECULARES EM DEMAIS ESTADOS DO BRASIL.

Ref.	Estado	N	Animais	Método	Freq.
Niciura et al., 2012	SP	33	Ovinos	Nested-PCR e ARMS-PCR	52
Brasil et al., 2012	MG, SP e SC	4	Ovinos	Nested-PCR	19.9
			Caprinos	Sequenciamento	27.5
Nunes et al., 2013	MG, SP	3	Bubalinos, ovinos e caprinos	PCR alelo-específico	8
Chagas et al., 2016	PA	12	Ovinos	Genotipagem	49
Santos et al., 2017b	CE	20	Ovinos	PCR alelo-específico	34.2
Lambert et al., 2017	BA	29	Ovinos	qPCR	42.2
			Caprinos	qPCR	42.2
Fávero et al., 2020	PA	61	Bovinos	PCR convencional e	11
	RS			Pirosequenciamento	21.5
	MS				3

FONTE: A autora (2021).

O alelo resistente para o SNP F167Y foi encontrado em frequências superiores as relatadas por Brasil et al. (2012). Estudos feitos por Santos et al. (2017b) e Lambert et al. (2017) com qPCR apresentaram altas frequências desse SNP (média 58.3 e 50%, respectivamente) em 20 propriedades de ovinos no CE e 29 de caprinos na BA. A alta frequência do SNP F167Y no CE pode ser justificada pelo tipo de produção ovina nesse Estado, que apresenta o 3º e 4º maior rebanho de ovinos e caprinos, respectivamente. Essa alta população animal está associada ao comércio restrito aos mercados locais e com deslocamento limitado dos animais em longas distâncias (SANTOS et al., 2017b). O baixo movimento de animais pode ser um fator na prevalência de resistência ao SNP F167Y dentro do CE, enquanto que o movimento interestadual limitado pode ter mantido a resistência no SNP F200Y em níveis muito baixos (SANTOS et al., 2017b). Além disso, como os BZ são anti-helmínticos mais baratos e de mais fácil acesso, torna a pressão de seleção a esse fármaco maior no CE onde os produtores possuem um poder aquisitivo geralmente menor em comparação com produtores paranaenses. No PR, de acordo com Thomaz-Soccol et al. (1996), de 1989 até 1994, mais de 400.000 animais foram importados do Uruguai e RS onde já havia relatos de resistência, com isso, a livre circulação de ovinos do Uruguai e do RS para o PR pode ter resultado na importação de parasitos com resistência. Este fato, somado a ausência de quarentena neste grande volume de animais, pode ter facilitado a disseminação e a permanência de isolados resistentes aos BZ e outras drogas. Além disso, como observado nos resultados desse estudo, os BZ não são a classe de anti-helmínticos mais utilizados, com alta frequência de uso de lactonas macrocíclicas (LM) e LEV, logo a pressão de seleção no PR é menor para BZ e maior para LM. Contudo, o monitoramento do SNP F167Y ao longo

dos anos, é necessário para determinar a evolução e alteração da frequência de alelos resistentes dessa mutação.

Outro aspecto do manejo que seja interessante discutir é que a grande maioria das propriedades fazia o cálculo de dose com base na estimativa visual de peso dos animais. Nesse contexto, deve-se ressaltar que na grande maioria das propriedades não havia balança e, mesmo naquelas em que havia, o manejo mais comum era estimar visualmente ou pesar o maior animal (ou mais pesado) e a partir desse, determinar a dose de anti-helmíntico para o restante dos animais do rebanho. Essa prática foi muito frequente e descrita pelos produtores como forma de facilitar o manejo (principalmente naquelas em que havia um grande número de animais). Com isso, a administração de superdoses de anti-helmínticos, conhecido como importante fator no aumento da pressão de seleção e redução da refugia, pode ser um dos manejos que mais influenciou a alta frequência de resistência para a mutação F200Y nesses rebanhos.

Em nosso estudo, a média de alelos resistentes foi de 54.3% para F200Y e 15.8% para F167Y. Em estudo feito por Santos et al (2014), a média de alelos resistentes para F200Y e F167Y foi de 26 e 83%, respectivamente em isolados de campo de *H. contortus*. Outro estudo feito por Williamson et al. (2011) apresentou frequências de alelos resistentes de 95% para o SNP F200Y e 40% para o SNP F167Y nos isolados de *H. contortus* US/HcS e UGA/2004. Estes dados nos permitem sugerir que uma população de parasitos pode ser resistente a um determinado SNP e ainda carrear SNP de resistência em outros loci (SANTOS et al., 2014).

A ausência de alelos resistentes da mutação E198A pode ser justificada pela alta frequência do SNP F200Y. Barrère et al. (2012), em estudo feito com 24 ovinos infectados artificialmente com *H. contortus*, não encontrou nenhum parasito com mais de duas mutações. Kotze et al. (2012), determinou em seu estudo que a resistência do F200Y e E198A começaram aproximadamente no mesmo nível para o isolado de Wallangra, mas que ao aumentar as concentrações de tiabendazol, a resistência em E198A aumentou e ao mesmo tempo diminuiu a F200Y. Ghisi et al. (2007) estudaram 25 alelos de beta-tubulina clonados e sequenciados de isolados de *H. contortus*. Os autores determinaram que todos menos um carregavam a mutação F200Y ou a mutação E198A. Esses dados sugerem que parasitos com as duas mutações são pouco frequentes. Contudo, visto que em um estudo feito por Santos et al. (2017b), foram detectados traços do alelo resistente para esse SNP (primeiro relato no Brasil), sua pesquisa também é necessária em larga escala no PR.

7 CONCLUSÃO

A frequência de alelos resistentes dos polimorfismos F200Y e F167Y concomitantemente estão presentes em 75% das populações de *H. contortus* em pequenos ruminantes do Oeste Paranaense. O SNP F200Y é o polimorfismo mais comum nessa região, contudo a emergência da resistência associada ao SNP F167Y também foi observada. O uso da qPCR pode reduzir o tempo e o custo do diagnóstico da resistência parasitária, além de ser eficiente em inquéritos em larga escala. Para melhorar o acesso a essa metodologia nessa região, recomenda-se a criação de parcerias com cooperativas locais que já possuem estrutura laboratorial para controle de doenças em aves e suínos (criações mais populares nessa região do PR). Por meio de tais parcerias e com a popularização dessa técnica com subsequente queda no custo de realização, essa metodologia pode auxiliar a cadeia produtiva de ovinos e caprinos nessa região do PR, principalmente com a padronização dessas técnicas para detecção de resistência para outros anti-helmínticos como BZ, LM e LEV.

Práticas de manejo associadas a alta frequência de resistência foram encontradas nesse estudo, como: alta frequência de tratamentos (média de 6x/ano; 15/18), cálculo de dose por estimativa visual de peso (15/18), ausência de consórcio com outros herbívoros (14/18), tratamento de todos os animais do rebanho (14/18), ausência de quarentena (10/18) e baixa adesão do método FAMACHA (4/18). Apesar de tais práticas não terem sido estatisticamente associadas ao diagnóstico das mutações em *H. contortus* nas propriedades avaliadas, elas podem servir de alerta para a emergência da resistência parasitária nesses rebanhos e orientar práticas de tratamento seletivo que podem retardar a resistência e, potencialmente, diluir os genes nos SNPs presentes, com um potencial impacto sobre mais de 10.000 ovinos e 1.800 caprinos dessa região.

8 REFERENCIAS

BALTRUŠIS, P.; HALVARSSON, P.; HÖGLUND, J. Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.8, n. 3, p. 411-419, 2018.

BARRÈRE, V.; ALVAREZ, L.; SUAREZ, G.; et al. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 344-349, 2012.

BARRÈRE, V.; KELLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; PRICHARD, R. K. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, p. 464–470, 2013.

BRASIL, B.S.A.F.; NUNES, R. L. A; BASTIANETTO, E. B; DRUMMONDA, M.G.; CARVALHO, D.C.; LEITE, R.C.; MOLENTO, M.B.; OLIVEIRA, D.A.A. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 469–479, 2012.

CHAGAS, A. M.; SAMPAIO JUNIOR, F. D.; PACHECO, A.; CUNHA, A. B.; CRUZ, J. S.; SCOFIELD, A. GOÊS-CAVALCANTE, G. F200Y polymorphism of the β -tubulin isotype 1 gene in *Haemonchus contortus* and sheep flock management practices related to anthelmintic resistance in eastern Amazon. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 104-108, 2016.

CRUZ, D. G.; DA ROCHA, L. O.; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G.; CORDEIRO, R. C.; SANTOS, E.; MOLENTO, M. B., SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p.340-343, 2010.

CUNHA FILHO, L. F. C.; PEREIRA, A. B. L.; YAHAMAMURA, M. H. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Londrina - Paraná - Brasil. **Semina**, v. 19, p. 31-37, 1998.

ELMAHALAWY, S. T.; HALVARSSON, P.; SKARIN, M.; HÖGLUND, J. Genetic variants in dyf-7 validated by droplet digital PCR are not drivers for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 278–286, 2018.

FÁVERO, F. C.; SANTOS, L. B.; ARAÚJO, F.; RAMUNKE, S.; KRUCKEN, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BORGES, F. A. *Haemonchus* sp. in beef cattle in Brazil: species composition and frequency of benzimidazole resistance alleles. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 185, p. 105-162, 2020.

FOZ DO IGUAÇU. **A cidade**. 2020. Disponível em: <<https://goo.gl/maps/pa5umViJyrnJSNdi8>>.

GERMER, S.; HOLLAND, M.J.; HIGUCHI, R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. **Genome Research**, v. 10, p. 258–266, 2000.

GHISI, M. KAMINSKY, R.; MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 313-320, 2007.

IBGE. **Censo Agropecuário 2019**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>.

IBGE. **Cidades**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/>>.

ISHII, J. B.; ARENAL, A.; FELIX, A.; YOSHITANI, U.; BEECH, R.; MOLENTO, M. B. Diagnosis of resistance alleles in codon 167 of the beta-tubulin (Cya-tbb-1) gene from third-stage larvae of horse cyathostomins. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 92-95, 2017.

KOTZE, A.C.; COWLING, K.; BAGNALL, N.H.; HINES, B.M.; RUFFELL, A.P.; HUNT, P.W.; COLEMAN, G.T. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 92–97, 2012.

KŘÍŽOVÁ-FORSTOVÁ V, LAMKA J, CVILINK V, HANUŠOVÁ V, SKÁLOVÁ L. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: the consequences and potential risks. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 333-41, 2011.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 885–936, 1988.

LAMBERT, S. M.; NISHI, S. M. MENDONÇA, L. R.; SOUZA, B. M. P. S.; JULIÃO, F. S.; GUSMÃO, P. S.; ALMEIDA, M. A. O. Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of *Haemonchus contortus* of goats. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 28-34, 2017.

LEATHWICK, D. M; HOSKING, B. C.; BISSET, S. A.; McKAY, C. H. Managing anthelmintic resistance: Is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, p. 181-192, 2009.

MOTTIER, M. D. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 2, p. 129–140, 2008.

NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; GROMBONI, J. G. G.; et al. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 608–612, 2012.

NUNES, R. L.; SANTOS, L. L. BASTIANETTO, E. OLIVEIRA, D. A. A.; BRASIL, B. S. A. F. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 548-553, 2013.

PRICHARD, R. K.; HALL, C. A.; KELLY, J. D.; MARTIN, I. C.; DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239-251, 1980.

ROBERTS, F.H.S. & O’SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99–102, 1950.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; CAMURCA-VASCONCELOS, A.L.; VIEIRA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.199, p. 160–164, 2014.

SANTOS, J. M. L.; VASCONCELOS, J. F.; FROTA, G. A.; RIBEIRO, W. L. C.; ANDRÉ, W. P. P.; VIERIA, L. S.; TEIXEIRA, M.; BEVILAQUA, M. L.; MONTEIRO, J. P. *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 90-95, 2017.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; ARAÚJO-FILHO, J.V.; ANDRE, W.P.P.; ARAÚJO, P.R.M.; VASCONCELOS, J.F.; FREITAS, E.P.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State. **Brazil Small Ruminant Research**, v. 146, p. 48–52, 2017b.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSÔA SILVA, M. C.; MILEZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSÔA SILVA, M. C. Resistance of Gastrointestinal

Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 159-173, 2008.

TURNBULL, F.; JONSSON, N. N.; KENYON, F.; SKUCE, P. J.; BISSET, S. A. P-glycoprotein-9 and macrocyclic lactone resistance status in selected strains of the ovine gastrointestinal nematode, *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 70–80, 2018.

VAN WYK, J.A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2013.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 209–216, 2012.

WILLIAMSON, S. M.; STOREY, B.; HOWELL, S.; et al. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 2, p. 99–105, 2011.

CAPÍTULO III

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve por objetivo determinar molecularmente o panorama da resistência parasitária com o teste de qPCR para as mutações que representam o mecanismo de resistência aos BZ em pequenos ruminantes do Oeste do PR, Brasil. O estudo partiu da hipótese de que o controle parasitário inadequado em propriedades de ovinos e caprinos dessa região permitiu o surgimento de populações de *H. contortus* resistentes aos BZ e que estes apresentariam ao menos um dos três polimorfismos associados a esse tipo de resistência.

Muitas práticas sanitárias consideradas fatores de risco para a seleção da resistência parasitária que foram relatadas em outros trabalhos foram descritas nas propriedades avaliadas nesse estudo. São elas a alta frequência de tratamentos, cálculo de dose por estimativa visual de peso, ausência de bovinos e/ou equinos no mesmo pasto, tratamento de todos os animais do rebanho, ausência de quarentena e ausência do método FAMACHA. Contudo, esse dado não foi estatisticamente comprovado nessa pesquisa.

1.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É necessário que futuros estudos avaliem e caracterizem a resistência fenotípica desses isolados por meio de TRCOF e métodos *in vitro* que devem ser conduzidos para o melhor entendimento da dinâmica da resistência nos rebanhos dessas localidades. Além disso, é necessário a correlação de dados de manejo com diagnóstico molecular por qPCR da frequência de alelos resistentes para os SNPs F200Y, F167Y e E198A em isolados de campo de *H. contortus* em mais propriedades do PR. A associação de práticas de manejo com o diagnóstico molecular da resistência pode auxiliar criadores e veterinários na escolha de melhores práticas para o controle do desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em rebanhos de ovinos e caprinos.

Avaliações moleculares com o uso de qPCR para a detecção da resistência ao levamisol também podem ser relevantes, visto que em várias propriedades avaliadas o uso desse anti-helmíntico teve uma alta frequência. Por fim, estudos que identifiquem em qual nível a frequência de mutações é expressa fenotipicamente também são necessários.

REFERÊNCIAS GERAIS

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p. 91-106, 2004.

ALVAREZ, L. I.; IMPERIALE, F. A.; SÁNCHEZ, S. F.; MURNO, G. A.; LANUSSE, C. E. Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 75-89, 2000.

ASHRAF, S.; PRICHARD, R. K. *Haemonchus contortus* microtubules are cold resistant. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 20–22, 2014.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 2003.

AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; LEWIS, R.; YAZWINSKI, T. A.; WASMUTH, J. D.; GILLEARD, J. S. Exploring the gastrointestinal "Nemabiome": Deep Amplicon Sequencing to Quantify the Species Composition of Parasitic Nematode Communities. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. 1-18, 2015.

AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; LEWIS, R.; BICHUETTE, M. A.; PALMEIRA, B. M.; YAZWINSKI, T. A.; GILLEARD, J. S. The use of nemabiome metabarcoding to explore gastro-intestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. **International Journal for Parasitology**, v. 47, p. 893-902, 2017.

AVRAMENKO, R. W.; REDMAN, E. M.; MELVILLE, L.; BARTLEY, Y. WIT, J.; QUEIROZ, C.; BARTLEY, D.; GILLEARD, J. S. Deep amplicon sequencing as a powerful new tool to screen for sequence polymorphisms associated with anthelmintic resistance in parasitic nematode populations. **International Journal for Parasitology**, v. 49, p. 13-26, 2019.

BALTRUŠIS, P.; HALVARSSON, P.; HÖGLUND, J. Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 411–419, 2018.

BARRÈRE, V.; ALVAREZ, L.; SUAREZ, G.; et al. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -

tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 344–349, 2012.

BARRÈRE, V.; KELLER, K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; PRICHARD, R. K. Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, p. 464–470, 2013.

BARTRAM, D. J. LEATHWICK, D. M.; TAYLOR, M. A.; GEURDEN, T.; MAEDER, S. J. The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 3-4, 2012.

BENAVIDES, M. V.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. Genomic Regions Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 470–480, 2016.

BERGER, J. The resistance of a field strain of *Haemonchus contortus* to five benzimidazole anthelmintics in current use. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 46, p. 369-372, 1975.

BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 95-143.

BESIER, R. B.; HOPKINS, D. L. Anthelmintic dose selection by farmers. **Australian Veterinary Journal**, V. 65, N. 6, P. 193-194, 1988.

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 1–2, p. 101–107, 2008.

BRASIL, B. S. A. F.; NUNES, R. L.; BASTIANETTO, E.; et al. Genetic diversity patterns of *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* populations isolated from domestic ruminants in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 469–479, 2012.

BROWN, H.D.; MATZUK, A.R.; ILVES, I.R.; PETERSON, L.H.; HARRIS, S.A.; SARETT, L.H.; EGERTON, J.R.; YAKSTIS, J.J.; CAMPBELL, W.C.; CUCKLER, A.C., Antiparasitic drugs-IV. 2-(40-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, p. 1764-1765, 1961.

BURKE, J. M.; MILLER, J. E. Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/resilience in offspring of stud rams. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 85-92, 2008.

CARMICHAEL, I., VISSER, R., SCHNEIDER, D., SOLL, M. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.58, p. 93, 1987.

CEPIN, U. **Real-time PCR (qPCR) technology basics**. 2017. Disponível em: <<https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>>.

CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Protocolos fenotípicos para nematoides gastrintestinais. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 23-54.

CHAGAS, A. M.; SAMPAIO JUNIOR, F. D.; PACHECO, A.; CUNHA, A. B.; CRUZ, J. S.; SCOFIELD, A. GOÉS-CAVALCANTE, G. F200Y polymorphism of the β -tubulin isotype 1 gene in *Haemonchus contortus* and sheep flock management practices related to anthelmintic resistance in eastern Amazon. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 104-108, 2016.

CHAUDHRY, U.; REDMAN, E.M.; RAMAN, M.; GILLEARD, J.S.; Genetic evidence for the spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 721–728, 2015.

COSTA, A. L. Manejo sanitário e principais doenças de caprinos e ovinos. In: **SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA; SEMANA DA CAPRINO-OVINOCULTURA BRASILEIRA; FEIRA DE PRODUTOS E DE SERVIÇOS AGROPECUÁRIOS**. Fortaleza: Federação da Agricultura do Estado do Ceará, 2002. p. 219-248.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.1, p.65-71, 2011.

COLES, G.C.; ROUSH, R.T. Slowing the spread of anthelmintic-resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. **Veterinary Research**. v. 130, p. 505- 510, 1992.

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S., KLEI, T.R., TAYLOR, M.A., WALLER P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

(WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992b.

CRAIG, T.M. Gastrointestinal Nematodes, Diagnosis and Control. **Veterinary Clinics North America - Food Animal Practice**, v. 34, p. 185–99, 2018.

CRUZ, D. G.; DA ROCHA, L. O.; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G.; CORDEIRO, R. C.; SANTOS, E.; MOLENTO, M. B., SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p.340-343, 2010.

CUDEKOVÁ, P.; VÁRADY, M.; DOLINSKÁ, M.; KÖNIGOVÁ, A. Phenotypic and genotypic characterization of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 155–159, 2010.

CUNHA-FILHO, L. F. C.; PEREIRA, A. B. L.; YAHAMAMURA, M. H. Resistência a anti-helmínticos em ovinos da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Semina**, v. 19, p. 31-37, 1998.

DALAL, S., PRASAD, A., NASIR, A., SAINI, V.K. Cross antigenicity of immunodominant polypeptides of somatic antigen of *Oesophagostomum columbianum* with other helminths by western blotting. **Vet World.**, v. 8, p. 1279–85, 2015.

DEMELER, J.; KRÜCKEN, J.; ALGUSBI, S.; et al. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 188, n. 1, p. 10–19, 2013.

DRUDGE, J.H.; SZANTO, J.; WYATT, Z.N.; ELAM G. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

EDWARDS, G. T.; SIAN, E.; MITCHELL, E.; HARDWOOD, D. G. Anthelmintic use in goats. **Veterinary Record**, v. 161, n. 22, p. 763-764, 2007.

ELMAHALAWY, S. T.; HALVARSSON, P.; SKARIN, M.; HÖGLUND, J. Genetic variants in *dyf-7* validated by droplet digital PCR are not drivers for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 278–286, 2018.

ESTEBAN-BALLESTEROS, M.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; SKUCE, P. J.; et al. Quantification of resistant alleles in the β -tubulin gene of field strains of gastrointestinal

nematodes and their relation with the faecal egg count reduction test. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2017.

FÁVERO, F. C.; SANTOS, L. B.; ARAÚJO, F.; RAMUNKE, S.; KRUCKEN, J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; BORGES, F. A. *Haemonchus* sp. in beef cattle in Brazil: species composition and frequency of benzimidazole resistance alleles. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 185, p. 105-162, 2020.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants: Advances and limitations for diagnosis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.

FOZ DO IGUAÇU. **A cidade**. 2020. Disponível em: <
<https://goo.gl/maps/pa5umViJyrnJSNdi8>>.

GERMER, S.; HOLLAND, M.J.; HIGUCHI, R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. **Genome Research**, v. 10, p. 258–266, 2000.

GHISI, M. KAMINSKY, R.; MASER, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 313-320, 2007.

GILLEARD, J. A.; REDMAN, E. Genetic Diversity and Population Structure of *Haemonchus contortus*. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 31-68.

GODOY, P.; CHE, H.; BEECH, R. N.; PRICHARD, R. K. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 52, p. 1-11, 2016.

GOUVEIA, A. M. G.; MOLENTO, M. B.; SILVA, M. X.; BRANDÃO, H. M. GOUVEIA, G. C.; MORLÁN, J. B.; GUIMARÃES, A. S. Management practices to control gastrointestinal parasites in sheep farms in Minas Gerais, southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 464-468, 2013.

GREEN, P. E.; FORSYTH, B. A.; ROWAN, K. J.; PAYNE, G. The Isolation of a Field Strain of *Haemonchus Contortus* in Queensland Showing Multiple Anthelmintic Resistance. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 2, p. 79–84, 1981.

GUIMARÃES, A. S.; GOUVEIA, A. M. G.; CARMO, F. B.; GOUVEIA, G. C.; SILVA, M. X.; VIEIRA, L. S.; MOLENTO, M. B. Management practices to control gastrointestinal parasites in dairy and beef goats in Minas Gerais; Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 265-269, 2011.

GUNAWAN, M., SANGSTER, N.C., KELLY, J.D., GRIFFIN, D., WHITLOCK, H.V. The efficacy of fenbendazole and albendazole against immature and adult stages of benzimidazole resistant sheep trichostrongylids. **Research in Veterinary Science**. v. 27, p. 111-115, 1979.

HENNESSY, D. R. Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. **Parasitology Today**, v. 9, n. 9, p. 329-333, 1993.

HO, N. F.; GEARY, T. G.; BARSUHN, C. L.; SIMS, S. M.; THOMPSON, D. P. Mechanistic studies in the transticular delivery of antiparasitic drugs. II: Ex vivo/in vitro correlation of solute transport by *Ascaris suum*, v. 52, n. 1, p. 1-13, 1992.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; QUIJADA, J.; CHAN-PEREZ, I.; DAKHEEL, M. M.; KOMMURU, D. S.; MUELLER-HARVEY, I.; TERRIL, T. H. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 239-351.

HOUDIJK, J. G. M. Influence of periparturient nutritional demand on resistance to parasites in livestock. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 2, p. 113-121, 2008.

HUMBERT, J. F.; CABARET, J.; ELARD, L.; LEIGNEL, V.; SILVESTRE, A. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 405-414, 2001.

HUMBERT, J-F.; ELARD, L. A simple PCR method for rapidly detecting defined point mutations. **Technical Tips**, v. 2, p. 48-49, 1997.

IBGE. **Censo Agropecuário 2019**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>.

IBGE. **Censo Agropecuário 2017**. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=41&tema=1>.

IBGE. **Cidades**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/>>.

IDR-PARANÁ. **Ovinos e Caprinos**. Disponível em: <
<http://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Ovinos-e-Caprinos>>.

ISHII, J. B.; ARENAL, A.; FELIX, A.; YOSHITANI, U.; BEECH, R.; MOLENTO, M. B. Diagnosis of resistance alleles in codon 167 of the beta-tubulin (Cya-tbb-1) gene from third-stage larvae of horse cyathostomins. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 92-95, 2017.

JABBAR, A.; IQBAL, Z.; KERBOEUF, D.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M. N.; AFAQ, M. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, p. 2414-2431, 2006.

JACKSON, F.; VARADY, M.; BARTLEY, D. J. Managing anthelmintic resistance in goats - Can we learn lessons from sheep?. **Small Ruminant Research**, v. 103, n. 1, p. 3-9, 2012.

KEARNEY, P. E.; MURRAY, P. J.; HOY, J. M.; HOHENHAUS, M.; KOTZE, A. The 'Toolbox' of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What's in and what's out. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 93-107, 2016.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 397-428.

KOTZE, A.C.; COWLING, K.; BAGNALL, N.H.; HINES, B.M.; RUFFELL, A.P.; HUNT, P.W.; COLEMAN, G.T. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 92–97, 2012.

KŘÍŽOVÁ-FORSTOVÁ V, LAMKA J, CVILINK V, HANUŠOVÁ V, SKÁLOVÁ L. Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: the consequences and potential risks. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 333-41, 2011.

KWA, M. S. G.; VEENSTRA, J. G.; VAN DIJK, M.; ROOS, M. H. β -tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, n. 4, p. 500–510, 1995.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 7, p. 885–936, 1988.

LAING, R.; KIKUCHI, T.; MARTINELLI, A.; et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. **Genome Biology**, v. 14, n. 8, p. R88, 2013.

LAMBERT, S. M.; NISHI, S. M. MENDONÇA, L. R.; SOUZA, B. M. P. S.; JULIÃO, F. S.; GUSMÃO, P. S.; ALMEIDA, M. A. O. Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of *Haemonchus contortus* of goats. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 28-34, 2017.

LANUSSE, C. E.; PRICHARD, R. K. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. **Drug metabolism reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-279, 1993.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ, A. L. Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode. In: GASSER, R. B. SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. ***Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends**. Elsevier, 2016. p. 465-518.

LEATHWICK, D. M; HOSKING, B. C.; BISSET, S. A.; McKAY, C. H. Managing anthelmintic resistance: Is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, p. 181-192, 2009.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, E. P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 107–119, 1994.

LUO, X.; SHI, X.; YUAN, C.; et al. Genome-wide SNP analysis using 2b-RAD sequencing identifies the candidate genes putatively associated with resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

MATÉ, L.; BALLENT, M.; CANTÓN, C.; et al. Assessment of P-glycoprotein gene expression in adult stage of *Haemonchus contortus* *in vivo* exposed to ivermectin. **Veterinary Parasitology**, v. 264, p. 1–7, 2018.

MEDEROS, A. E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G. E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–4, 2014.

MOHANDAS, N.; YOUNG, N. D.; JABBAR, A.; KORHONEN, P. K.; KOEHLER, A. V.; HALL, R. S.; HU, M.; HOFMANN, A.; GASSER, R. B. The complement of family M1 aminopeptidases of *Haemonchus contortus* - Biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 2, p. 65-76, 2016.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229-234, 2009.

MOLENTO, M. B.; VAN WYK, J. A.; COLES, G. C. Sustainable worm management. **The Veterinary Record**, v. 155, n. 3, p. 95-96, 2004.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GELDHOFF, P. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 126-132, 2011.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 75-86, 1999.

MOTTIER, M. D. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 2, p. 129–140, 2008.

MOTTIER, M. L.; ALVAREZ, L. I.; PIS, M. A.; LANUSSE, C. E. Transtegumental of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol-water partition coefficients. **Experimental parasitology**, v. 103, p. 1-7, 2003.

MUCHIUT, S. M.; FERNÁNDEZ, A. S.; STEFFAN, P. E.; RIVA, E.; FIEL, C. A. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 43–48, 2018.

NAEEM, M.; IQBAL, Z.; ROOHI, N. Ovine haemonchosis: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-11, 2021.

NGUYEN, L.T., KURZ, T., PRESTON, S., BRUECKMANN, H., LUNGERICH, B., HERATH, H. M. P. D. I., ET AL. Phenotypic screening of the “Kurz-box” of chemicals identifies two compounds (BLK127 and HBK4) with anthelmintic activity in vitro against parasitic larval stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites and Vectors**, v. 12:, p. 1–9, 2019.

NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; GROMBONI, J. G. G.; et al. F200Y polymorphism in the β -tubulin gene in field isolates of *Haemonchus contortus* and risk factors of sheep flock management practices related to anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3–4, p. 608–612, 2012.

NUNES, R. L.; SANTOS, L. L. BASTIANETTO, E. OLIVEIRA, D. A. A.; BRASIL, B. S. A. F. Frequency of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* populations isolated from buffalo, goat and sheep herds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 548–553, 2013.

PALEVICH, N.; MACLEAN, P. H.; BATEN, A.; et al. The Genome Sequence of the Anthelmintic-Susceptible New Zealand *Haemonchus contortus*. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1965–1970, 2019.

PAPADOPOULOS, E., GALLIDIS, E., PTOCHOS, S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 85–8, 2012.

PARANÁ, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Boletim agropecuário aborda a ovinocultura paranaense**. 2021. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Boletim-agropecuário-aborda-ovinocultura-paranaense>>.

PRESTON, S.; JABBAR, A.; GASSER, R. B. A perspective on genomic-guided anthelmintic discovery and repurposing using *Haemonchus contortus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 368–373, 2016.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 445–453, 2001.

PRICHARD, R. K.; HALL, C. A.; KELLY, J. D.; MARTIN, I. C.; DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239–251, 1980.

REDMAN, E.; WHITELAW, F.; TAIT, A.; BURGESS, C.; BARTLEY, Y.; SKUCE, P.J.; JACKSON, F.; GILLEARD, J.S. The emergence of resistance to the benzimidazole

anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterized by multiple independent hard and soft selective sweeps. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-24, 2015.

ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99–102, 1950.

SALLÉ, G.; LAING, R.; COTTON, J. A.; MAITLAND, K.; MARTINELLI, K.; HOLROYD, N.; TRACEY, A.; BERRIMAN, M.; SMITH, W. D.; NEWLANDS, G. F. J.; HANKS, E.; DEVANEY, E.; BRITTON, C. Transcriptomic profiling of nematode parasites surviving vaccine exposure. **International Journal for Parasitology**, v. 48, p. 395-402, 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; CAMURCA-VASCONCELOS, A.L.; VIEIRA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.199, p. 160–164, 2014.

SANTOS, J.M.L.; MONTEIRO, J.P.; RIBEIRO, W.L.C.; MACEDO, I.T.F.; ARAÚJO-FILHO, J.V.; ANDRE, W.P.P.; ARAÚJO, P.R.M.; VASCONCELOS, J.F.; FREITAS, E.P.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; BEVILAQUA, C.M.L. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State. **Brazil Small Ruminant Research**, v. 146, p. 48–52, 2017.

SANTOS, J. M. L.; VASCONCELOS, J. F.; FROTA, G. A.; RIBEIRO, W. L. C.; ANDRÉ, W. P. P.; VIERIA, L. S.; TEIXEIRA, M.; BEVILAQUA, M. L.; MONTEIRO, J. P. *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 90-95, 2017.

SCHEUERLE, M. C.; MAHLING, M.; PFISTER, K. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and Southern Germany. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 121, n. 3, p. 46–49, 2009.

SCHWARZ, E. M.; KORHONEN, P. K.; CAMPBELL, B. E.; et al. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. **Genome Biology**, v. 14, n. 8, 2013.

SILVESTRE, A.; CABARET, J. Mutation in position 167 of isotype 1 b-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? **Molecular Biochemistry and Parasitology**, v.120, p. 297-300, 2002.

SOUTHCOTT, W. H.; BARGER, I. A. Control of nematode parasites by grazing management - II: Decontamination of sheep and cattle pastures by varying periods of grazing with the alternate host. **International Journal for Parasitology**, v. 5, p. 45-48, 1975.

SOUZA, P; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; RAMOS, C. I. Período para desinfestação das pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos em condições naturais nos campos de Lages, SC. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 159-164, 2000.

SPRENGER, L. K.; AMARAL, C. H.; FILHO, R. V. L.; AGUIAR, T. N. MOLENTO, M. B. Eficácia do fosfato de levamisol em nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, p. 28-39, 2013.

TAYLOR, M. A; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary parasitology**, v. 103, p. 183-94, 2002.

TERRILL, T. H.; KAPLAN, R. M.; LARSEN, M.; et al. Anthelmintic resistance on goat farms in Georgia: Efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in two selected goat herds. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 261–268, 2001.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; PESSÔA SILVA, M. C.; MILEZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; PESSÔA SILVA, M. C. Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 159-173, 2008.

TURNBULL, F.; JONSSON, N. N.; KENYON, F.; SKUCE, P. J.; BISSET, S. A. P-glycoprotein-9 and macrocyclic lactone resistance status in selected strains of the ovine gastrointestinal nematode, *Teladorsagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 70–80, 2018.

VAN WYK, J.A., GERBER, H.M. A field strain of *Haemonchus contortus* showing slight resistance to rafoxanide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 137 - 142, 1980.

VAN WYK, J.A., GERBER, H.M., ALVES, R.M. Slight resistance to the residual effect of closantel in a field strain of *Haemonchus contortus* which showed an increased resistance after one selection in the laboratory. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 257 - 261, 1982.

VAN WYK, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIER, R. B. Target selective treatment for worm management - How do we sell rational programs to farmers?. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 336-346, 2006.

VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animal for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p. 509-529, 2002.

VAN WYK, J.A.; MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2013.

VÁRADY, M., CORBA, J. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 239-249, 1999.

VELAN, A., HODA, M. In-silico comparison of inhibition of wild and drug-resistant *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype-1 by glycyrrhetic acid, thymol and albendazole interactions. **Journal of Parasitic Diseases**, 2020.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 209-216, 2012.

VERSCHAVE, S.H., ROSE, H., MORGAN, E.R., CLAEREBOU, E., VERCRUYSSSE, J., CHARLIER, J. Modelling *Cooperia oncophora*: Quantification of key parameters in the parasitic phase. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 111-4, 2016.

VICKERS, M.; YENNING, M.; MCKENNA, P. B.; MARIADASS, B. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in new zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 3, p. 101–105, 2001.

VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Nematoides gastrintestinais e pulmonares de caprinos. In: CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Ed.). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 65-94.

VILA NOVA, L. E.; COSTA, M. E.; MELO, P. G. C. F.; CUNHA FILHO, L. F. C.; BARCA JUNIOR, F. A.; SILVA, L. C.; OKANO, W.; BOGADO, A. L. G. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, p. 159-171, 2014.

VILELA, V. L. R.; FEITOSA, T. F.; LINHARES, E. F.; ATHAYDE, A. C. R.; MOLENTO, M. B.; AZEVEDO, S. S. FAMACHA method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 281-284, 2012.

VIRKEL, G. LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; PIS, A.; LANUSSE, C. Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 32, n. 5, p. 536-544, 2004.

WALSH, T. K.; DONNAN, A. A.; JACKSON, F.; SKUCE, P. WOLSTENHOLME, A. J. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 304-312, 2007.

WANG, T.; MA, G.; ANG, C.; KORHONEN, P. K.; KOEHLER, A. V.; YOUNG, N. D.; NIE, S.; WILLIAMSON, N. A.; GASSER, R. B. High throughput LC-MS/MS-based proteomic analysis of excretory-secretory products from short-term in vitro culture of *Haemonchus contortus*. **Journal of Proteomics**, v. 204, p. 1-9, 2019.

WEBB, R.F., MCCULLY, C.H. Resistance of *Haemonchus contortus* to oxfendazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, p. 347-348, 1979.

WHITTAKER, J. H.; CARLSON, S. A.; JONES, D. E.; BREWER, M. T. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 105–115, 2017.

WILLIAMSON, S. M.; STOREY, B.; HOWELL, S.; et al. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 2, p. 99–105, 2011.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 181–213, 1995.

WOOSTER, M. J.; WOODGATE, R. G.; CHICK, B. F. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 12, p. 840–842, 2001.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 014/2020, referente ao projeto de pesquisa “**Determinação de polimorfismos de nucleotídeo único associados a resistência a ivermectina em *Haemonchus contortus***”, sob a responsabilidade de **Marcelo Beltrão Molento** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em 08/05/2020.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Junho/2020 até Março/2021
Espécie/Linhagem	<i>Ovis aries</i> (ovino)/White Dorper
Número de animais	20
Peso/Idade	20 – 50 kg/12 meses
Sexo	Fêmea
Origem	Laboratório de Produção e Pesquisa de Ovinos e Caprinos da UFPR, Pinhais/PR, Brasil

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 014/2020, regarding the research project “**Determination of single nucleotide polymorphism associated with ivermectin resistant *Haemonchus contortus***” under **Marcelo Beltrão Molento** – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 08/05/2020.

Purpose	Research
Validity	June/2020 until March/2021
Species/Line	<i>Ovis aries</i> (ovine)/White Dorper
Number of animals	20
Weight/Age	20 – 50 kg/12 months
Sex	Female
Origin	Sheep and Goats Production and Research Center of the UFPR, Pinhais/PR, Brazil

Curitiba, 22 de maio de 2020

ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PRODUTORES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Prof. Marcelo Beltrão Molento - molento@ufpr.br
 Lab. De Doenças Parasitárias / Rua dos Funcionários, 1540. Curitiba, PR
 CEP: 80035-050 / Tel: (41) 3350-5618 / Cel. (41) 99946-5820

ESTUDO REGIONAL DE HELMINTOS DE OVINOS E CAPRINOS – QUESTIONÁRIO

DATA DA COLETA: ____ / ____ / 2020 Nº de amostras: _____

I. LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DA PROPRIEDADE:

1. Fazenda: _____ 2. Município/estado: _____
 3. Nome do proprietário: _____
 4. Área total da propriedade: _____ 5. Há quanto tempo atua na atividade: _____

II SOBRE OS ANIMAIS ANALISADOS:

1. Entre os animais analisados, quantos de cada classe?
 _____ Cordeiros/Cabritos (até 06 meses); _____ Ovelhas/Cabras prenhes; _____ Cordeiras/Cabritas (até 06 meses); _____ Capões/Bode; _____ Carneiros; _____ Ovelhas/Cabras; _____ Borregos (até 18 meses).
 2. Qual a raça dos ovinos/caprinos: _____
 3. Animais ficam estabulados? () Sim, () Não, () Apenas a noite (semi-estabulados)
 4. Há desinfecção dos estábulos? () Sim, () Não
 5. Qual é a frequência de retirada de esterco do estábulo? () Diariamente, () Outro: _____
 6. Dividem pasto com outras espécies: () Não, () Sim. Quais? _____
 7. Animais recém-adquiridos: () Tratados e isolados _____ dias. () Só isolados _____ dias.
 () Tratados e misturados sem isolamento. () São misturados sem tratamento.
 8. Os ANIMAIS ANALISADOS apresentam algum desses SINAIS CLÍNICOS no momento da coleta?
 () Dificuldade para respirar; () Corrimento Nasal; () Tosse; () Diarréia; () Prostração; () Apatia;
 () Outros _____
 9. Têm histórico de problemas com PARASITOS? () Não; () Sim. Qual? _____
 10. Já foi observado qualquer tipo de parasitos nos animais ou em suas fezes? () Não, () Sim, qual: _____
 11. Data do último tratamento com vermífugo no rebanho? _____. Qual produto? _____
 12. Como é feito o tratamento dos animais? () Todos os animais do rebanho; () Somente alguns animais ou lotes; () Com base em exames de fezes; () Em animais com sinais clínicos de verminose; () Estratégica (2x ano/seca); () Semestral; () Não trato.
 13. Qual a frequência do tratamento? _____
 14. É feito o controle da quantidade de vermes após a aplicação? () Não () Sim. Como? _____
 15. Já foi realizado teste de eficácia de produtos? () Não, () Sim: _____
 16. Qual o principal produto utilizado na propriedade? () ABA () IVM1% () IVM3.5% () DOR () LEV () ABZ (benz.) () Outro: _____
 17. Faz controle de ectoparasitas? Qual produto? _____
 18. Quando troca de vermífugo? () A cada tratamento, () De acordo com teste de eficácia do vermífugo () Quando o produto não faz mais efeito, () De acordo com orientação do veterinário, () Sem critério, () Nunca trocou.
 19. Como escolhe o medicamento antiparasitário? () Indicação do técnico/Veterinário, () Balconista de agropecuária ou Cooperativa, () Pelo menor preço, () Vendedor na fazenda, () Propaganda (revista, TV), () Outros: _____
 20. Como é feita a estimativa de peso dos animais? () Pesagem, () Fita de peso, () Estimativa visual
 21. Realiza o exame de fezes (OPG)? () Sempre que necessário, () A cada _____ meses, () Utilizo somente para testar a eficácia do vermífugo, () Não realizo exame de OPG, () nunca ouvi falar neste exame
 22. Possui assistência técnica? () Sim, Intervalo de tempo? _____ () Não.
 23. Adquire novas informações? () Rádio/TV, () Internet, () Livros/revistas, () Feiras/exposições, () Cursos/palestra, () Amigos/criadores
 24. Está informado sobre o problema da resistência dos parasitas aos medicamentos? () Sim () Não
 25. Adota algum outro sistema de controle parasitário? () Não, () Sim. Qual? _____

ANEXO 3 – DADOS DOS QUESTIONÁRIOS SANITÁRIOS

SIGLA	Tempo de atuação	Nº de animais	Tipo de criação	Raça	Dividem o pasto com outras espécies	Manejo de animais recém-adquiridos	Como é feito o tratamento	Frequência de tratamentos por ano	Rotação de princípios	Usa benzimidazóis	Usa mais de uma classe de drogas?	Cálculo de dose	Faz rotação de pastagem?	Faz FAMACHA?
FI1	5 anos	124	Semi-intensiva	Mestiços	Sim	Tratados e isolados	Em animais com sinais clínicos	4X	A cada tratamento	Sim	Sim	Pesagem	Não	Sim
MA1	10 anos	126	Semi-intensiva	Dorper e Texel	Não	Tratados e isolados	Em animais com sinais clínicos	Sem frequência	1 x por ano	Não	Sim	Estimativa visual	Sim	Sim
ME1	13 anos	288	Semi-intensiva	O = Dorper, Santa Inês / C = Boer	Não	Tratados e isolados	Todos os animais do rebanho	6x	A cada tratamento	Sim	Sim	Estimativa visual	Sim	Não
RM1	10 anos	82	Semi-intensiva	Mestiços	Sim	Misturados sem tratamento e isolamento	Todos os animais do rebanho	6X	Sem critério	Não	Sim	Estimativa visual	Não	Não
ST1	10 anos	31	Semi-intensiva	Mestiço	Não	Tratados e misturados sem isolamento	Todos os animais do rebanho	2x	A cada tratamento	Sim	Sim	Estimativa visual	Não	Não
ST2	15 anos	34	Semi-intensiva	Ilé de France	Não	Tratados e misturados sem isolamento	Todos os animais do rebanho	12x	A cada tratamento	Sim	Sim	Estimativa visual	Sim	Não
ST3	10 anos	80	Semi-intensiva	Mestiços	Não	Misturados sem tratamento e isolamento	Todos os animais do rebanho	12x	A cada tratamento	Sim	Sim	Estimativa visual	Não	Não
ST4	1 ano	10	Semi-intensiva	Mestiços	Não	Tratados e misturados sem isolamento	Todos os animais do rebanho	4x	Nunca trocou	Não	Não	Estimativa visual	Não	Não
ST5	1 ano	18	Semi-intensiva	Mestiços	Não	Tratados e isolados	Todos os animais do rebanho	4x	Nunca trocou	Não	Não	Estimativa visual	Sim	Não
ST6	5 anos	7	Semi-intensiva	Mestiço	Sim	Misturados sem tratamento e isolamento	Todos os animais do rebanho	2x	Nunca trocou	Não	Não	Estimativa visual	Não	Não
ST7	20 anos	115	Semi-intensiva	O = Mestiços / C = Boer	Não	Misturados sem tratamento e isolamento	Todos os animais do rebanho	12x	A cada tratamento	Sim	Sim	Estimativa visual	Sim	Não
SM1	3 meses	63	Semi-intensiva	Mestiços	Não	Tratados e misturados sem isolamento	Todos os animais do rebanho	6x	A cada tratamento	Não	Sim	Pesagem	Não	Não
SM2	10 anos	248	Semi-intensiva	Boer	Não	Tratados e isolados	Em animais com sinais clínicos	4x	A cada tratamento	Não	Sim	Pesagem	Sim	Sim
SM3	1 ano	33	Semi-intensiva	O = Dorper / C = Boer	Sim	Misturados sem tratamento e isolamento	Todos os animais do rebanho	1x	Nunca trocou	Não	Não	Estimativa visual	Não	Não
SM4	1 ano	71	Semi-intensiva	Dorper	Não	Tratados e isolados	Em animais com sinais clínicos	Sem frequência	Quando o produto não faz mais efeito	Sim	Sim	Estimativa visual	Não	Sim
SI1	10 anos	103	Semi-intensiva	Dorper	Não	Misturados sem tratamento e isolamento	Todos os animais do rebanho	3x	Quando o produto não faz mais efeito	Sim	Sim	Estimativa visual	Não	Não
SI2	30 anos	92	Semi-intensiva	Mestiços	Não	Tratados e isolados	Todos os animais do rebanho	Sem frequência	Nunca trocou	Não	Não	Estimativa visual	Sim	Não
VC	2 anos	172	Semi-intensiva	Santa Inês	Não	Tratados e isolados	Todos os animais do rebanho	12x	De acordo com orientação do veterinário	Sim	Sim	Estimativa visual	Sim	Não